



**HAL**  
open science

# Etude du rôle du récepteur nucléaire CAR, Constitutive Androstane Receptor, dans le métabolisme des lipides et la susceptibilité à l'athérosclérose

Anne-Laure Sberna

► **To cite this version:**

Anne-Laure Sberna. Etude du rôle du récepteur nucléaire CAR, Constitutive Androstane Receptor, dans le métabolisme des lipides et la susceptibilité à l'athérosclérose. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS094 . tel-00825474

**HAL Id: tel-00825474**

**<https://theses.hal.science/tel-00825474>**

Submitted on 23 May 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Sciences de l'Alimentation

Présentée et soutenue publiquement le 14 janvier 2011 par

Anne-Laure SBERNA

## **ETUDE DU ROLE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR, CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR, DANS LE METABOLISME DES LIPIDES ET LA SUSCEPTIBILITE A L'ATHEROSCLEROSE**

### Membres du jury

Pr. Luc Rochette	Professeur des Universités EA2979, LLPCE, Dijon	Président
Pr. Philippe SAAS	Professeur des Universités Inserm U645, Besançon	Rapporteur
Dr. Philippe LESNIK	Directeur de Recherche Inserm U939, Paris	Rapporteur
Pr. Jean-Marc LOBACCARO	Professeur des Universités Inserm U931, Clermont-Ferrand	Examineur
Dr. David MASSON	Maître de Conférence-Praticien Hospitalier Inserm U866, Dijon	Co-directeur de thèse
Dr. Laurent Lagrost	Directeur de Recherche Inserm U866, Dijon	Directeur de thèse



*Cette thèse a été réalisée au sein du Centre de Recherche INSERM U866 (Dijon, France), dans l'équipe « Protéines de Transfert des Lipides et Métabolisme des Lipoprotéines », dans le cadre de la formation à la recherche de l'École de l'INSERM Liliane Bettencourt.*

*Je tiens à remercier l'INSERM et le Conseil Régional de Bourgogne pour m'avoir attribué une allocation de recherche INSERM/Conseil Régional de Bourgogne m'ayant permis de me consacrer à la réalisation de ce projet.*

*Les travaux réalisés ont bénéficié du support financier du Conseil Régional de Bourgogne, de la Fondation de France, de l'Université de Bourgogne, de l'INSERM et de l'Agence Nationale pour la Recherche ATHEROLIP.*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'École de L'INSERM Liliane Bettencourt pour m'avoir permis de réaliser ce parcours peu commun. Grâce aux nombreuses formations proposées par cet organisme permettant aux étudiants en médecine d'être initiés à la recherche dès la deuxième année de médecine, j'ai pu accéder à la filière scientifique et réaliser un Master 2 à l'issue de ma troisième année de médecine.

Une chose en entraînant une autre,... aux vues des résultats forts encourageants de mes premiers travaux et de l'excellent accueil dont j'ai bénéficié au sein du Centre de Recherche INSERM U866 de Dijon, je me suis vue offert la possibilité de poursuivre l'aventure et de réaliser une thèse de science. Cette expérience fut extrêmement enrichissante, tant au niveau personnel que professionnel.

Ayant repris depuis plus d'un an mes études de médecine, j'ai mené de front la fin de la rédaction de ce manuscrit et ma formation médicale. Cette double casquette s'est avérée parfois dure à porter tant je me sentais investie tour à tour dans l'un ou l'autre domaine tant j'éprouve du plaisir que ce soit au laboratoire qu'à l'hôpital.

Mais le temps du redoutable Examen National Classant arrive, je vais donc à présent mettre toute mon énergie pour ce nouveau défi. J'espère ainsi m'offrir toutes les possibilités de poursuivre une carrière dans laquelle je pourrai mettre à profits tant mon expérience scientifique que mon goût pour la médecine.

## Remerciements

A Monsieur le Professeur **Philippe SAAS** et à Monsieur le Docteur **Philippe LESNIK** qui en dépit de leurs obligations ont accepté de juger mon travail et d'en être rapporteurs. Veuillez accepter mes sincères remerciements et soyez assurés de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur **Jean-Marc LOBACCARO** qui m'a fait l'honneur de siéger dans ce jury. Merci pour la pertinence de vos corrections. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur **Luc ROCHETTE** pour avoir accepté de présider ce jury et mener les débats.

## Remerciements

Voilà donc quelques années que j'arpente les bancs de l'école, ... certes le chemin est long, mais on a jamais été aussi proche de l'arrivée...courage !

Ces années ont été jalonnées de nombreux moments de joie et parfois d'instantanés moins plaisants, mais jamais de doute ni de regrets car j'ai la chance de compter à mes côtés de nombreuses personnes qui me soutiennent...

Je tiens à remercier personnellement

Monsieur le Docteur **David MASSON** pour m'avoir proposé ce sujet original (même si j'ai dû en passer par la CETP) et avoir mené avec une grande sagacité ce projet. Merci pour avoir mis avec optimisme la main à la patte et m'avoir offert le luxe de manger du homard à 6000km de Dijon. J'ai beaucoup appris durant ces années et par ce travail, j'espère être à la hauteur de l'estime que je te porte. Merci de tout mon cœur, je garderai toujours un très bon souvenir de ces années.

Monsieur le Docteur **Laurent LAGROST** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour la fougue et l'intelligence avec lesquelles tu as guidé l'embarcation ! Merci pour ton investissement et ta générosité.

A l'ensemble des personnes ayant participé à ces travaux, de près ou de loin, pour leurs conseils avisés et leur disponibilité infailible...

A Messieurs Philippe **BESNARD** et Jean-Michel **NARCE** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie pour votre contribution à faire avancer les débats.

A Anne **ATHIAS** pour m'avoir encadré durant mon stage de Master1 et m'avoir donné goût à la GC/MS (oui c'est possible...). Merci pour ta gentillesse et ta patience.

A Jean-Paul **PAIS DE BARROS** pour m'avoir appris à doser les protéines à l'œil. Merci pour ta patience, ta rigueur et ta gentillesse.

A Naig **LEGUERN** pour m'avoir appris à murmurer à l'oreille des souris et aussi pour ton soutien amical et ta clairvoyance.

A Thomas **GAUTIER** pour ton écoute attentive et ton aide sur mes questions existentielles à propos de CAR quand j'étais un peu perdue.

A Valérie **DECKERT** pour m'avoir initiée au monde mystérieux de la souris, merci pour ta patience.

A Jacques **GROBER** pour ta bonne humeur et à ton épouse qui m'a donné l'opportunité de tester mes compétences dans le domaine de l'enseignement (... !).

A Aline **momam-JEANNIN** pour toutes les anecdotes sur le thème « à deux c'est mieux pour faire des bêtises » et à Amandine **BATAILLE**. Merci pour votre fraîcheur d'esprit.

A l'ensemble de l'équipe de l'ANIMALERIE CENTRALE pour votre accueil et votre efficacité, toujours dans la bonne humeur (et aussi pour avoir joué le rôle d'entremetteur au 3420). Merci à Valérie, Anne, Florent, Jérôme, Nicolas, David et Vincent.

Au plateau d'histologie « CELLIMAP Plateforme d'Imagerie Cellulaire IFR100 » pour le travail sur les valves cardiaques.

A Alexandrine FRAICHARD pour ton efficacité et ta gentillesse.

A l'ensemble des personnes travaillant ou ayant travaillé au sein de l'équipe : D. BLACHE, S. LEMAIRE-EWING, D. NEEL, J. LABBE, G. MAQUART, T. NGUYEN, W. SALI., C. DESRUMAUX, M. RAVENEAU, C. REBE, A. KLEIN, N. OGIER.

Au Docteur Mahfoud ASSEM from Iowa City, fervent partisan de CAR et dresseur de souris CAR « moins-moins », que je n'ai jamais rencontré et ce n'est pas faute d'avoir essayé... en soulignant l'intérêt de l'équipe à m'envoyer m'occuper personnellement des rongeurs.

PS : Sans oublier le spider solitaire pour m'avoir montré la voie quand même pubmed n'y parvenait plus...



Et tout particulièrement...

A mes amis et toutes les personnes qui m'apportent joie et bonheur... Virginie, Aurélien, Raphaëlle, Cédric, Coralie, Julie, Xavier, Elsa, Caroline, Valérie, Leslie, Aurélia, Julie, Mylène, Elodie, Justine, Pauline... votre amitié m'est très précieuse.

A la multinationale Vivexia et sa PDGette Delphine CROISIER-BERTIN. Merci pour ta bonne humeur indéfectible !

A Fred pour ta gentillesse et ta bonne humeur (et aussi pour avoir corrigé ce pavé). Merci pour tous ces bons moments ...

A ma famille du Nord Isabelle, Bruno, Baptiste et les Rostankowski-Hayez (vous êtes trop nombreux pour détailler faudrait un tome 2 « Le retour de CAR ») pour m'avoir accueilli et permis de découvrir de nouveaux us et coutumes ! Merci à tous pour votre soutien et votre affection.

A Bostonnette (BigB) et Snowball (casse-c.....) qui ont eux aussi ont participé à leur façon, pas toujours très efficacement mais qui m'ont tenu compagnie durant cette rédaction. Maouhhhh !!!

A ma grand-mère et mon tonton Serge pour leur présence et leur affection.

A mes parents pour m'avoir donné le goût des études (un peu trop diront certains) et surtout la possibilité d'en abuser... Merci pour votre amour et votre soutien indéfectible.

A Davy, pour ta patience (même quand je parle trop...), tes douces attentions et ton amour. Merci d'être toujours à mes côtés et me faire aimer la vie jour après jour...Il nous reste encore tant de belles choses à vivre....

*En essayant continuellement on finit par réussir, donc plus ça  
rate plus on a de chances que ça marche...*

*<< Les Shadoks >>*

*A Davy, ma famille, mes amis*

# TABLE DES MATIERES

---

TABLE DES MATIERES .....	1
PUBLICATIONS .....	5
COMMUNICATIONS ORALES .....	6
COMMUNICATIONS AFFICHEES .....	7
INDEX DES FIGURES .....	8
INDEX DES TABLEAUX .....	9
LISTES DES ABREVIATIONS .....	10
AVANT-PROPOS .....	15

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 17

### RECEPTEURS NUCLEAIRES,GENERALITES..... 18

I. DEFINITION ET HISTORIQUE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES .....	18
II. CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES .....	19
III. STRUCTURE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES .....	20
A. <i>Domaine A/B</i> .....	21
B. <i>Domaine C ou domaine de liaison à l'ADN</i> .....	21
C. <i>Domaine D</i> .....	23
D. <i>Domaine E ou domaine de liaison au ligand</i> .....	23
E. <i>Domaine F</i> .....	24
IV. FONCTIONNEMENT DES RECEPTEURS NUCLEAIRES .....	24
A. <i>Ligands des récepteurs nucléaires</i> .....	24
B. <i>Localisation cellulaire des récepteurs nucléaires</i> .....	25
C. <i>Liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN</i> .....	25
D. <i>Activation de la transcription des gènes cibles par les récepteurs nucléaires</i> .....	27
1. <i>Liaison du ligand</i> .....	27
2. <i>Recrutement des co-régulateurs</i> .....	27
a. <i>Les co-activateurs des récepteurs nucléaires</i> .....	27

b.	Les co-répresseurs des récepteurs nucléaires .....	29
c.	Les co-régulateurs en action : recrutement des complexes de transcription ....	29
3.	Action des récepteurs nucléaires .....	30
<b>CAR, GENERALITES .....</b>		<b>32</b>
I.	DECOUVERTE DE CAR .....	32
A.	<i>Isolement et caractérisation de CAR</i> .....	32
B.	<i>CAR, un récepteur à activité constitutive ?</i> .....	33
C.	<i>Forme murine de CAR</i> .....	34
D.	<i>CAR, un récepteur nucléaire orphelin adopté</i> .....	34
E.	<i>CAR, le récepteur au phénobarbital</i> .....	36
II.	STRUCTURE DE CAR .....	36
A.	<i>Etude phylogénique</i> .....	36
B.	<i>CAR, du gène à la protéine</i> .....	36
C.	<i>Domaine de liaison à l'ADN de CAR</i> .....	38
D.	<i>Domaine de liaison au ligand de CAR</i> .....	39
E.	<i>Déterminants fonctionnels de CAR</i> .....	40
1.	Hétérodimérisation de CAR avec RXR .....	40
2.	Liaison du ligand sur CAR.....	41
a.	Liaison du TCPOBOP .....	41
b.	Liaison du CITCO et des dérivés prégnanediones .....	41
c.	Désactivation de l'activité basale de CAR.....	41
3.	Interaction de CAR avec ses co-régulateurs.....	42
a.	Les co-activateurs de CAR.....	43
b.	Les co-répresseurs de CAR.....	44
4.	Bases de l'activité constitutive de CAR.....	44
5.	Localisation cellulaire et translocation de CAR.....	45
a.	Phénomènes de phosphorylation .....	45
b.	Autres cascades de phosphorylation .....	47
c.	Domaines de CAR impliqués dans le trafic subcellulaire.....	47
6.	Expression de CAR .....	48
a.	Expression tissulaire de CAR.....	48
b.	Différences liées au sexe .....	49

7.	Ligands et modulateurs de CAR .....	49
8.	Interrelations entre CAR et les autres récepteurs nucléaires .....	50
III.	ROLES DE CAR .....	51
A.	<i>CAR et catabolisme des xénobiotiques</i> .....	52
B.	<i>CAR et détoxification des composés endogènes</i> .....	65
1.	CAR et métabolisme des hormones stéroïdiennes .....	65
2.	CAR et métabolisme des hormones thyroïdiennes .....	67
3.	CAR et métabolisme de la bilirubine et de l'hème .....	69
4.	Existence d'autres ligands ou régulateurs endogènes de CAR .....	70
C.	<i>CAR et prolifération hépatique</i> .....	70
D.	<i>CAR et métabolisme des acides biliaires</i> .....	72
E.	<i>CAR et métabolisme des lipides</i> .....	76
1.	Effet du phénobarbital sur le bilan lipidique et le risque cardio-vasculaire.....	76
a.	Données épidémiologiques .....	76
b.	Effets du phénobarbital chez l'Animal.....	77
2.	CAR et métabolisme des triglycérides et stéatose hépatique.....	77
3.	Interférences entre CAR et les voies métaboliques dépendantes de PPAR $\alpha$ .....	78
4.	CAR et métabolisme du cholestérol.....	80

## **ETUDE EXPERIMENTALE..... 82**

### **ARTICLE 1..... 83**

I.	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	83
II.	ARTICLE 1 .....	84
III.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	125

### **ARTICLE 2..... 131**

I.	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	131
II.	CHOIX DES MODELES D'ETUDE .....	132
III.	ARTICLE 2 .....	134
IV.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	166

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>170</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>171</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>218</b>

# PUBLICATIONS

---

Lakomy, D., Rebe, C., **Sberna, A. L.**, Masson, D., Gautier, T., Chevriaux, A., Raveneau, M., Ogier, N., Nguyen, A. T., Gambert, P., Grober, J., Bonnotte, B., Solary, E., and Lagrost, L. (2009) Liver X receptor-mediated induction of cholesteryl ester transfer protein expression is selectively impaired in inflammatory macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1923-1929.

Rebe, C., Raveneau, M., Chevriaux, A., Lakomy, D., **Sberna, A. L.**, Costa, A., Bessede, G., Athias, A., Steinmetz, E., Lobaccaro, J. M., Alves, G., Menicacci, A., Vachenc, S., Solary, E., Gambert, P., and Masson, D. (2009) Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages, *Circ Res* 105, 393-401.

Gautier, T., Klein, A., Deckert, V., Desrumaux, C., Ogier, N., **Sberna, A. L.**, Paul, C., Le Guern, N., Athias, A., Montange, T., Monier, S., Piard, F., Jiang, X. C., Masson, D., and Lagrost, L. (2008) Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice, *J Biol Chem* 283, 18702-18710.

Masson, D., Qatanani, M., **Sberna, A. L.**, Xiao, R., Pais de Barros, J. P., Grober, J., Deckert, V., Athias, A., Gambert, P., Lagrost, L., Moore, D. D., and Assem, M. (2008) Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice, *J Lipid Res* 49, 1682-1691.

**Sberna, A.L.**, Assem M., Gautier, T., Grober, J., Guiu, B., Jeannin A., Pais de Barros, J. P., Athias, A., Lagrost, L., Masson, D. Constitutive androstane receptor activation stimulates fecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice, *J.hepatol sous presse*.

**Sberna, A.L.**, Assem M., Gautier, T., Guiu, B., Deckert, V., Chevriaux, A., Grober, J., Le Guern, N., Pais de Barros, J. P., Athias, A., Lagrost, L., Masson, D. Pharmacological activation of the constitutive androstane receptor (CAR) decreases mice plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis in LDL receptor-deficient, *soumis à Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

# COMMUNICATIONS ORALES

---

« Activation of the constitutive androstane receptor (CAR) decreases plasma triglycerides and LDL cholesterol levels and reduces atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. » **XVème Symposium International sur l'Athérosclérose (Boston, Etats-Unis), 14-18 juin 2009.** *Communication orale par D. Masson.*

« Impact du récepteur nucléaire CAR (Constitutive Androstane Receptor) sur le métabolisme des lipoprotéines et le développement de l'athérosclérose. » **Journées Scientifiques de l'Ecole de l'INSERM (Paris, France), 4-6 septembre 2008.** *Communication orale par A. L. Sberna.*

« Effet du TCPOBOP, agoniste du récepteur nucléaire CAR (Constitutive Androstane Receptor) sur le développement de lésions athéromateuses chez la Souris hyperlipidémique ApoE<sup>-/-</sup> et sur le profil lipoprotéique de la Souris CETP transgénique. » **Journées Scientifiques de l'Ecole de l'INSERM (Paris, France), 6-9 septembre 2007** *Communication orale par A. L. Sberna.*

« Modulation du profil lipoprotéique par les Récepteurs Nucléaires CAR et PXR chez des souris transgéniques CETP. » **Journées Scientifiques Ecole de l'INSERM (Paris, France), 8-10 septembre 2006.** *Communication orale par A. L. Sberna.*



# COMMUNICATIONS AFFICHEES

---

« Effet du TCPOBOP, agoniste du récepteur nucléaire CAR (Constitutive Androstane Receptor) sur le développement de lésions athéromateuses chez la Souris hyperlipidémique Ldlr-/- . » **Forum des Jeunes Chercheurs (Dijon, France), 12-13 juin 2008.**

« Effets de la stimulation du récepteur nucléaire CAR sur le métabolisme lipidiques et l'athérosclérose. » **4ème congrès annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (Biarritz, France), 14-16 juin 2007.**

« Effet du TCPOBOP, agoniste du récepteur nucléaire CAR (Constitutive Androstane Receptor) sur le profil lipoprotéique de souris CETP-transgéniques. » **Forum des Jeunes Chercheurs (Besançon, France), 7-8 juin 2007.**

# INDEX DES FIGURES

---

<b>FIGURE 1 : STRUCTURE GENERALE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES</b> .....	21
<b>FIGURE 2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DOMAINE C DE LIAISON A L'ADN D'UN RECEPTEUR NUCLEAIRE</b> .....	22
<b>FIGURE 3 : MODE DE LIAISON DES RECEPTEURS NUCLEAIRES A L'ADN</b> .....	26
<b>FIGURE 4 : ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES</b> .....	30
<b>FIGURE 5 : EXEMPLE DE CO-REGULATION PAR LE RECEPTEUR AUX GLUCOCORTICOÏDES</b> .....	31
<b>FIGURE 6 : DISTRIBUTION TISSULAIRE DES ARN MESSAGERS DE CAR CHEZ L'HOMME</b> .....	33
<b>FIGURE 7 : MODE D'ACTION DE CAR</b> .....	35
<b>FIGURE 8 : ORGANISATION DU GENE HUMAIN CODANT LE RECEPTEUR CAR, ARN MESSAGER ET PROTEINE</b> .....	37
<b>FIGURE 9 : MODELE STRUCTURAL DU DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND DE LA FORME HUMAINE DE CAR</b> .....	40
<b>FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PASSAGE DE LA FORME ACTIVE A LA FORME INACTIVE DE CAR EN PRESENCE DE SON AGONISTE INVERSE, L'ANDROSTANOL</b> .....	42
<b>FIGURE 11 : STRUCTURE CHIMIQUE DE DIFFERENTS LIGANDS DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR</b>	43
<b>FIGURE 12 : ACTIVATION ET TRANSLOCATION DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR</b> .....	46
<b>FIGURE 13 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES DOMAINES FONCTIONNELS DE CAR CHEZ LE RAT INTERVENANT DANS LE TRAFIC SUBCELLULAIRE DU RECEPTEUR</b> .....	48
<b>FIGURE 14 : ROLE DE CAR DANS LE METABOLISME THYROÏDIEN</b> .....	68
<b>FIGURE 15 : REGULATION COORDONNEE PAR LE RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME BILIAIRE AU NIVEAU HEPATIQUE ET INTESTINAL CHEZ LES SOURIS DYSLIPIDEMIQUES LDLR-/- SOUS REGIME ENRICHI EN CHOLESTEROL</b> .....	129
<b>FIGURE 16 : IMPLICATION DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR DANS LE TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL CHEZ LES SOURIS LDLR-/- SOUS REGIME ENRICHI EN CHOLESTEROL</b> .....	130

# INDEX DES TABLEAUX

---

<b>TABLEAU 1 : ELEMENTS DE REPOSE RECONNUS PAR CAR .....</b>	<b>38</b>
<b>TABLEAU 2 : INTERRELATIONS ENTRE CAR ET SES RECEPTEURS APPARENTES .....</b>	<b>50</b>
<b>TABLEAU 3 : MODULATEURS DE L'ACTIVITE DE CAR CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS .....</b>	<b>54</b>
<b>TABLEAU 4 : CIBLES DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DES XENOBIOTIQUES .....</b>	<b>61</b>
<b>TABLEAU 5 : HORMONES SEXUELLES SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER L'ACTIVITE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR.....</b>	<b>66</b>
<b>TABLEAU 6 : REGULATEURS ENDOGENES POTENTIELS DU RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR .....</b>	<b>70</b>
<b>TABLEAU 7 : REGULATION COORDONNEE DU METABOLISME BILIAIRE PAR LE RECEPTEUR NUCLEAIRE CAR.....</b>	<b>73</b>

# LISTES DES ABBREVIATIONS

---

**Abca1** : ATP Binding Transporter A1

**Abcb11** : ATP Binding Cassette B11

**Abcc2** : ATP Binding Cassette C2

**Abcc3** : ATP Binding Cassette C3

**Abcc4** : ATP Binding Cassette C4

**Abcg1** : ATP Binding Transporter g1

**Abcg5/8** : ATP-binding cassette sub-family G5/8

**Acc** : Acetyl-CoA Carboxylase

**Acox** : Acyl Coenzyme-A Oxydase

**AF-1** : Activation Function

**AF-2** : Activation Function 2

**AMPC** : Adénosine MonoPhosphate cyclique

**Aox** : Acyl-Coenzyme A Oxydase

**AP-1** : Activator Protein 1

**Apo-B** : Apolipoprotéine B

**Apo-E** : Apolipoprotéine E

**ApoE-/-** : Apolipoprotein E deficient

**AR** : Androgen Receptor

**Asbt** : Apical Sodium Bile acid Transporter

**Asc** : Acyl-Coenzyme A Synthase

**ASC-2** : Activating Signal Cointegrator-2

**Bat** : Bile acid Coenzyme A:amino acid N-acyltransferase

**Bcrp** : Breast Cancer Resistance Protein

**BRG** : Brahma-Related Gene 1

**Bsep** : Bile Salt Export Pump

**CAR** : Constitutive Androstane Receptor

**CARM1** : Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1

**CBP** : cAMP response element-Binding Protein

**CCR** : Cytoplasmic Retention Region

**Ccrp** : Cytoplasmic CAR Retention Protein

**CITCO** : 6-(4-chlorophenyl) imidazo [2,1-b][1,3]-thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime

**CoA** : Coenzyme A  
**COUP-TF I et II** : Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I  
**Cpt1** : Carnitine Palmitoyltransferase 1  
**Cte1**: Cytosolic Acyl-Coenzyme A Thioesterase  
**CTE** : C-Terminal Extension  
**CYP** : Cytochrome oxydase  
**DAX-1** : Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1  
**DBD** : DNA Binding Domain  
**DR** : Direct Repeat  
**DRIP** : vitamin D Receptor-Interacting Protein  
**Elov5** : Elongase 5  
**ER** : Estrogen Receptor  
**ER-2** : ApoE Receptor 2  
**Erk** : Extracellular signal-Regulated Kinase  
**ERR** : Estrogen-Related Receptor  
**Fas** : Fatty Acid Synthase  
**Fgf-15** : Fibroblast Growth Factor 15  
**Fgfr4** : Fibroblast Growth Factor receptor 4  
**FoxO1** : Forkhead transcription factor O1  
**FoxOm1** : Forkhead bOX M1  
**Gadd45** : Growth Arrest and DNA-Damage-inducible  
**GCNF** : Germ Cell Nuclear Factor-like  
**GK** : GlucoKinase  
**GR** : Glucocorticoid Receptor  
**GRIP1** : Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1  
**Gst** : Glutathion-S-Transférases  
**HDL** : High Density Lipoprotein  
**Hep G2** : Hepatocytes G2  
**HGF** : Hepatic Growth Factor  
**HNF-4** : Hepatic Nuclear Factor-4  
**HIF-1** : Hypoxia-Inducible Factor-1  
**HRE** : Hormone Response Element  
**Hsp** : Heat Shock Protein

**IDL** : Intermediate Density Lipoprotein  
**IL1- $\beta$**  : Interleukine 1- $\beta$   
**IL6** : Interleukine 6  
**iNos** : Inducible Nitric Oxide Synthase  
**Insig1** : Insulin-induced gene 1  
**IR** : Inverse Repeat  
**Jnk 1/2** : c-Jun NH2-terminal Kinase 1/2  
**LBP** : Ligand Binding Pocket  
**LDB** : Ligand Binding Domain  
**LDL** Low Density Lipoprotein  
**Ldlr** : Low Density Lipoprotein Receptor  
**LRH-1** : Liver Receptor Homolog-1  
**Lrp** : Low-density-lipoprotein-receptor-related protein  
**LXR** : Liver X Receptor  
**Mcl1** : Myeloid Cell Leukemia sequence 1  
**Mdm2** : Mouse Double Minute-2  
**Mdr1** : Multi Drug Resistance 1  
**Mek** : Mitogen-activated protein kinase Kinase  
**Mrp2** : Multidrug Resistance gene-associated Protein 2  
**Mrp3** : Multidrug Resistance gene-associated Protein 3  
**Mrp4** : Multidrug Resistance gene-associated Protein 4  
**NCoR** : Nuclear receptor Co-Repressor  
**NES** : Nuclear Export Signal  
**NGFIB** : Nerve Growth Factor IB  
**NLS** : Nuclear Localization Signal  
**NOR1** : Neuron-derived Orphan Receptor 1  
**NR** : Nuclear Receptor  
**Ntcp** : Na<sup>+</sup>dependent Taurocholic Cotransporting Polypeptide  
**NURR1** : NUclear Receptor Related 1  
**Oatp** : Organic Anion-Transporting Polypeptide  
**Osta/ $\beta$**  : Organic Solute Transporters  $\alpha/\beta$   
**P/CAF** : P300/Cbp-Associated Factor  
**PGC1** : PPAR $\gamma$ Co-activator 1

**Pp1r16a** : sous-unité de la Protéine Phosphatase 1 bêta  
**PPAR** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
**PPRE** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element  
**PPRIP** : Peroxisome Proliferator-activated Receptor binding Protein  
**PR** : Progesterone Receptor  
**PRMT1** : Protein aRginine Methyltransferase 1  
**PXR** : Pregnane X Receptor  
**RAR** : Retinoic Acid Receptor  
**RE** : Response Element  
**RID** : Receptor Interaction Domain  
**RN** : Récepteur Nucléaire  
**ROR** : Retinoic acid receptor-related Receptor  
**RSC** : Remodeling the Structure of Chromatin  
**RXR** : Retinoid X Receptor  
**Scap** : SREBP cleavage-activating protein  
**Scd1** : Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1  
**SF-1** : Steroidogenic Factor 1  
**SH** : Small Hepatocytes  
**SHP** : Small Heterodimer Partner  
**SMILE** : SMall heterodimer partner Interacting LEucine zipper protein  
**SMRT** : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor  
**SNF** : Sucrose Fermentation  
**SNuRMs** : Selective Nuclear Receptor Modulators  
**SRC** : Steroid Receptor Coactivator  
**Srebp 1c** : sterol-regulatory-element binding protein ;  
**SREMs** : Selective estrogen REceptor Modulators  
**Stat-5** : Signal Transducer and Activator of Transcription 5  
**Sult2a1** : Sulfotransférase 2a1  
**SWI** : mating-type Switching  
**TCPOBOP** : 3,3',5,5'-Tétrachloro-1,4-bis (pyridyloxy)benzene  
**TIF2** : Transcriptional Intermediate Factor 2  
**TR $\beta$**  : Testicular Receptor  $\beta$   
**TRAP** : Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein

**Ugt** : UDP-glucuronyltransférases

**VDR** : Vitamin D Receptor

**VLDL** : Very Low Density Lipoprotein

**XRS** : Xenobiotic Response Sequence



# AVANT-PROPOS

---

Les maladies cardio-vasculaires représentent une cause majeure de mortalité dans les pays occidentaux et leur prévalence ne cesse d'augmenter. Selon les pays, un adulte sur quatre ou cinq présente un syndrome métabolique associant dyslipidémie, diabète et stéatose hépatique. Ainsi, ces pathologies font l'objet depuis plusieurs décennies de nombreuses recherches pour le développement de stratégies thérapeutiques. Parmi ces cibles, les récepteurs nucléaires ont récemment fait l'objet de nombreuses investigations en raison de leur capacité à moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et le développement de l'athérosclérose.

De façon générale, les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles. Ils participent ainsi à l'homéostasie de nombreuses fonctions biologiques comme la croissance, la reproduction et le métabolisme [1-5]. De multiples études recensent les effets des récepteurs nucléaires dans des processus physiopathologiques comme le cancer et l'athérosclérose [6-20].

Parmi les récepteurs nucléaires présents chez l'Homme et la Souris le récepteur CAR, Constitutive Androstane Receptor est un acteur majeur de la reconnaissance des molécules exogènes (xénobiotiques) et la protection de l'organisme. Ce récepteur a été identifié pour la première fois en 1994 par Baes et *al.* [21]. Il lie de nombreuses molécules comme des polluants, des médicaments et des dérivés alimentaires induisant en retour leur détoxification. Le récepteur CAR est principalement exprimé au niveau des organes intervenant dans les processus d'élimination notamment le foie, l'intestin et les reins. Son activation pharmacologique stimule l'expression coordonnée des enzymes de détoxification (phase I), de conjugaison (phase II) et les transporteurs (phase III), aboutissant à la transformation des xénobiotiques en molécules hydrophiles moins toxiques et plus facilement éliminables.

En plus de ses fonctions de « xénosenseur », CAR intervient également dans le métabolisme endogène, notamment dans le métabolisme des acides biliaires, de la bilirubine, de l'hème, des triglycérides et des hormones thyroïdiennes. Le principal rôle décrit pour CAR concernant le métabolisme endogène est sa capacité à promouvoir la détoxification des acides biliaires lors des cholestases.

En ce qui concerne le métabolisme du cholestérol, deux études indépendantes ont démontré que CAR était capable de moduler le profil lipoprotéique [22, 23]. Les autres récepteurs appartenant à la même famille que CAR, notamment FXR, LXR et PPAR $\alpha$  ont déjà été décrits comme des cibles potentielles pour le traitement des dyslipidémies et de l'athérosclérose [17, 18, 20]. Or, bien peu d'éléments sont connus sur l'impact de CAR sur le métabolisme des lipoprotéines dans des conditions de surcharge en cholestérol. Dans ce contexte, il a semblé pertinent d'étudier les effets d'une stimulation chronique et spécifique de CAR sur le métabolisme des lipides et la susceptibilité à l'athérosclérose dans deux modèles de souris dyslipidémiques.

Dans ce travail, l'état actuel des connaissances concernant le récepteur CAR a été rapporté. Le rôle de CAR dans le métabolisme biliaire a fait l'objet d'une partie bibliographique détaillée et d'une étude expérimentale publiée dans *Journal of Hepatology*. Cet article a permis de montrer que CAR par ses effets sur le métabolisme des acides biliaires était capable de stimuler le retour du cholestérol périphérique au foie, suggérant un rôle bénéfique du récepteur dans le métabolisme des lipides. Dans un second temps, l'impact de CAR dans le métabolisme des lipides a été détaillé et a fait l'objet d'un deuxième article soumis pour publication à *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Ces travaux ont montré que CAR était capable de réduire le taux de lipoprotéines riches en apolipoprotéine B, diminuant ainsi l'athérogénicité du plasma. *In vivo*, cet effet se traduit par une réduction des lésions athéromateuses chez des souris dyslipidémiques déficientes pour le récepteur aux lipoprotéines de basse densité. L'ensemble des travaux menés a ainsi permis de démontrer que CAR peut être considéré comme un nouvel acteur du métabolisme lipidique et pourrait devenir une cible thérapeutique intéressante dans la prise en charge des dyslipidémies et la prévention de l'athérosclérose.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES, GÉNÉRALITÉS

---

Les récepteurs nucléaires forment une superfamille de récepteurs intracellulaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription [1]. Ils sont stimulés par liaison de ligands de nature lipophile et modulent l'expression de gènes cibles. Initialement, les récepteurs qui ne possédaient pas de ligands clairement identifiés au moment de leur découverte ou qui étaient actifs de façon constitutive (sans liaison de ligands) ont été qualifiés « d'orphelins ». Les récepteurs nucléaires participent au contrôle de mécanismes cellulaires fondamentaux comme l'apoptose, la prolifération, la différenciation et l'homéostasie et interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques comme la croissance, la reproduction et le métabolisme énergétique [2-4].

## I. Définition et historique des récepteurs nucléaires

La première notion de récepteurs intracellulaires a été introduite par Jensen et *al.* en 1962 qui ont observé que l'œstradiol est retenu au sein des cellules cibles, évoquant la présence d'un récepteur intracellulaire spécifique [24]. Des expériences similaires ont permis 20 ans plus tard de confirmer que les hormones liposolubles ont pour récepteurs des protéines intracellulaires, nommées récepteurs nucléaires. Ainsi, le premier récepteur nucléaire cloné fut le récepteur humain aux glucocorticoïdes (GR, Glucocorticoid Receptor) [25] et le second le récepteur aux œstrogènes (ER, Estrogen Receptor) [26]. Rapidement, de nombreux récepteurs ont pu être identifiés à partir de banques d'ADN complémentaire. Ces récepteurs sont retrouvés dans l'ensemble du règne animal [27]. Chez l'Homme, quarante-huit membres ont d'ores et déjà été identifiés, 49 chez la Souris, 47 chez le Rat et plus de 270 membres putatifs chez *Caenorhabditis elegans* [28, 29].

## II. Classification et nomenclature des récepteurs nucléaires

Des études phylogéniques reposant sur l'analyse de séquences hautement conservées entre les espèces (domaine C et E) ont permis de montrer que l'ensemble des récepteurs sont issus de l'évolution d'un récepteur unique, apparu chez les métazoaires avant la séparation entre les vertébrés et les invertébrés [30]. Une seconde vague de réplication (entre les arthropodes et les vertébrés) a permis l'émergence d'une grande diversité de récepteurs [31].

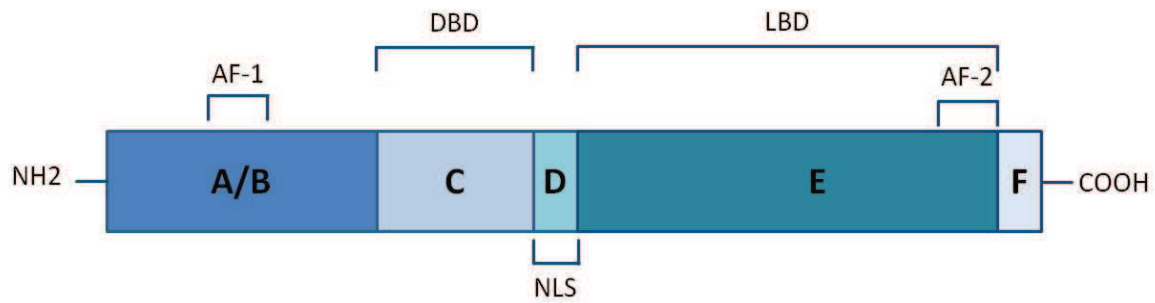
Les quarante-huit récepteurs nucléaires humains sont ainsi groupés en six sous-familles de taille inégale, caractérisées non pas par la ressemblance de leur ligand, mais par leur mode de liaison à l'ADN et leur capacité de dimérisation [28, 31-33]. Les récepteurs ne possédant pas de ligands connus ou identifiés sont nommés récepteurs orphelins [34]. La classification des récepteurs nucléaires est similaire à celle des cytochromes P450 établie par Nebert *et al.* [35]. La nomenclature détaillée est insérée en Annexe 1.

- **Groupe 1** (NR1, Nuclear Receptor 1) : comprend les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs, Thyroid Receptors) et des récepteurs apparentés comme le récepteur à la vitamine D (VDR, Vitamin D Receptor), les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs, Retinoic Acid Receptors), les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) et certains récepteurs orphelins comme les récepteurs RORs (Retinoic acid receptOr-related Receptors) et Rev-erb alpha ainsi que les récepteurs CAR (Constitutive Androstane Receptor), PXR (Pregnane X Receptor) et LXR (Liver X Receptor).
- **Groupe 2** (NR2, Nuclear Receptor 2) : comprend les récepteurs à l'acide rétinoïque RXRs (Retinoid X Receptors) et des récepteurs orphelins apparentés comme HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4), COUP-TF I et II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I) et les récepteurs testiculaires (TRs, Testicular Receptors).

- **Groupe 3** (NR3, Nuclear Receptor 3) : comprend les récepteurs aux hormones stéroïdes dont les récepteurs aux œstrogènes (ERs, Estrogen Receptors) et des récepteurs apparentés comme ERRs (Estrogen-Related Receptors), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR, Glucocorticoid Receptor), à la progestérone (PR, Progesterone Receptor) et aux androgènes (AR, Androgen Receptor).
- **Groupe 4** (NR4, Nuclear Receptor 4) : comprend les récepteurs orphelins de type NGFIB (Nerve Growth Factor IB) et des récepteurs apparentés comme NURR1 (NUclear Receptor Related 1) et NOR1 (Neuron-derived Orphan Receptor 1).
- **Groupe 5** (NR5, Nuclear Receptor 5) : comprend le récepteur SF1 (Steroidogenic Factor 1) et le récepteur apparenté LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1).
- **Groupe 6** (NR6, Nuclear Receptor6) : comprend les récepteurs orphelins de type GCNF (Germ Cell Nuclear Factor-like).
- **Groupe 0** (NR0, Nuclear Receptor 0) : comprend les récepteurs DAX-1 (Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1) et SHP (Small Heterodimer Partner).

### **III. Structure des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires ont une taille variant de 40 à 100 kilodaltons et présentent la même structure générale, comprenant généralement quatre domaines fonctionnels notés de A à E. Un cinquième domaine (F) peut être décrit pour certains récepteurs nucléaires [36, 37].



**Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires comprenant six domaines (A à F) de l'extrémité N-Terminale (NH<sub>2</sub>) à l'extrémité C-Terminale (COOH).** Le domaine A/B contient une fonction activatrice de la transcription dite indépendante du ligand AF-1 (Activation Function 1) ; le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) ; le domaine D ou charnière contenant un motif de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) ; le domaine E ou domaine de liaison du ligand (LBD, Ligand Binding Domain) renferme la fonction activatrice de la transcription dite dépendante du ligand AF-2 (Activation Function 2) ; le domaine F inconstant [37-40].

## A. Domaine A/B

La région N-Terminale (domaine A/B) est la plus variable en termes de taille et de séquence protéique. Ce domaine contient une fonction activatrice de la transcription dite indépendante du ligand (AF-1, Activation Function-1) [1, 41]. Bien qu'AF-1 présente une activité constitutive lorsqu'elle est isolée, elle est en revanche activée par la liaison du ligand au sein du récepteur entier. Cette région peut être soumise à des modifications post-transcriptionnelles [42, 43]. Elle est capable d'interagir avec différents cofacteurs. La grande variabilité de ce domaine détermine la diversité des isoformes et leur spécificité cellulaire et par conséquent leur fonction.

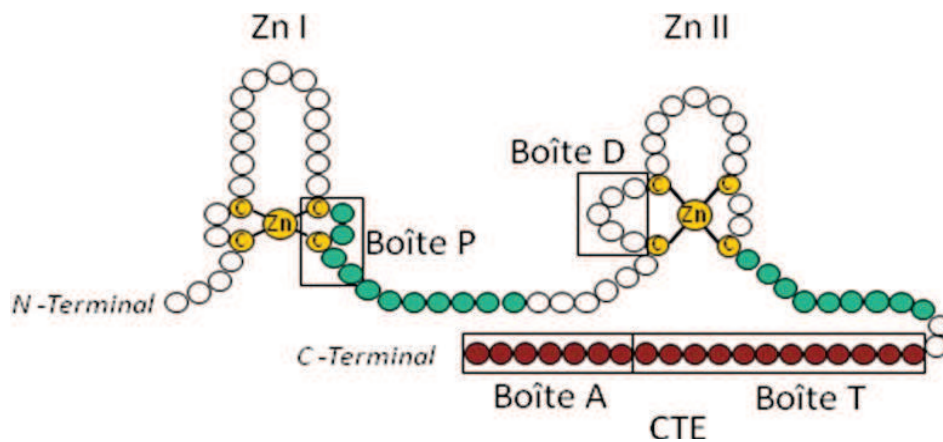
## B. Domaine C ou domaine de liaison à l'ADN

Cette région est le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain). Il présente une forte homologie de séquence entre les différents récepteurs nucléaires [2, 44, 45].

Il permet au récepteur nucléaire de lier l'ADN de ces gènes cibles au niveau de séquences particulières nommées élément de réponse (RE, Response Element ou HRE, Hormone Response Element). Composé au moins de soixante-dix acides aminés, il présente :

- **deux motifs en doigt de zinc** organisés autour de résidus cystéines comportant des séquences particulières : 1) la boîte P située dans le premier motif, responsable de la spécificité de liaison à l'ADN [31, 46] ; 2) la boîte D située dans le deuxième motif, intervenant dans les phénomènes de dimérisation conférant de la stabilité de liaison à l'ADN [47-49].
- **une extension C-terminale** (CTE, C-Terminal Extension) contenant deux séquences particulières (boîtes A et T) participant à la reconnaissance et à la dimérisation.

La structure tertiaire du domaine de liaison à l'ADN présente trois hélices alpha permettant le repliement et l'orientation du domaine sur l'élément de réponse du gène cible [45].



**Figure 2: Représentation schématique du domaine C de liaison à l'ADN d'un récepteur nucléaire réalisé à partir des séquences connues de récepteurs nucléaires humains.** Les résidus aminés sont représentés par des ronds. Le domaine de liaison à l'ADN comporte une boîte P, une boîte D, deux motifs en doigt de zinc (Zn I et II), deux hélices alpha hautement conservées (ronds verts), une extension C-Terminale (CTE, C-Terminal Extension) partie variable du domaine C [50, 51].



## C. Domaine D

Cette région charnière entre les domaines C et E est faiblement conservée. Elle confère au récepteur sa flexibilité participant à la fixation sur l'ADN. Ce domaine comprend des éléments pouvant intervenir dans la localisation nucléaire du récepteur [52].

## D. Domaine E ou domaine de liaison au ligand

Ce domaine est le support de nombreuses fonctions. Il est formé de douze hélices alpha (H1 à H12), un tour bêta entre les hélices 5 et 6 et deux feuillets bêta (S1-S2) organisés en trois couches antiparallèles [53, 54]. Il comporte :

- **une poche de liaison au ligand** (LBP, Ligand Binding Pocket),
- **une interface de dimérisation** au niveau de l'hélice 10 de type : xxKxxxKxxxRxx (x : résidus aminé hydrophobe, K : Lysine, R : Arginine), spécifique au partenaire du récepteur [53, 55-57],
- **une surface de liaison aux co-régulateurs,**
- **un domaine de transactivation** AF-2 (Activation Function 2) dépendant du ligand au niveau de l'hélice 12 [58, 59].

La taille de la poche de liaison du ligand varie selon les récepteurs et détermine la spécificité de reconnaissance du ligand. Cette poche est composée de deux hélices repliées au centre et forme une cavité hydrophobe dans laquelle se fixe le ligand [47]. En l'absence de ligand, l'hélice 12 forme un couvercle au-dessus de la poche de liaison du ligand. Le modèle proposé par Moras et *al.* [49] suggère que l'hélice 12 se comporte comme un couvercle se repliant sur l'agoniste et permettant la liaison de co-activateurs. En revanche, en l'absence de ligand, l'hélice 12 n'est pas repliée et lie les co-répresseurs. Le domaine adopte alors une position active en présence d'agoniste et une multitude de positions possibles en présence d'agoniste inverse ou en l'absence de ligand.

## E. Domaine F

Cette région très variable, absente chez certains récepteurs exercerait une action régulatrice.

# IV. Fonctionnement des récepteurs nucléaires

## A. Ligands des récepteurs nucléaires

Les ligands sont des molécules d'origine endogène (produits du métabolisme) ou exogène (dérivés alimentaires, médicaments, polluants regroupés sous le terme de xénobiotiques). Généralement de petite taille, ils sont de nature hydrophobe.

Il existe quatre catégories de ligands aux récepteurs nucléaires [60] :

- **Agonistes** : ils se lient au niveau de la poche de liaison du ligand et induisent un changement de conformation permettant le recrutement de co-activateurs nécessaires à l'activation de la transcription. Ils augmentent l'activité transcriptionnelle basale.
- **Antagonistes purs** : ils empêchent le recrutement de co-régulateurs et s'opposent à la transcription des gènes cibles, mais n'affectent pas l'activité basale des récepteurs.
- **Agonistes inverses** : ils diminuent l'activité basale des récepteurs en favorisant le recrutement de co-répresseurs.
- **Agonistes/antagonistes partiels** : ils possèdent une efficacité réduite par rapport aux agonistes et antagonistes purs. Leurs effets dépendent du type cellulaire, du contexte intracellulaire et de la présence de co-régulateurs. Il s'agit notamment des modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires (SNuRMs, Selective Nuclear Receptor Modulators): SREMs (Selective estrogen REceptor Modulators), les modulateurs de des récepteurs PPAR et AR [61-63].

## B. Localisation cellulaire des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires peuvent être présents dans le cytoplasme (cas du récepteur aux glucocorticoïdes) ou dans le noyau des cellules sous forme liée ou non à l'ADN.

Le ratio entre la forme cytoplasmique et nucléaire dépend du récepteur et de la nature du ligand. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la mobilité des récepteurs au sein du noyau et la nature dynamique de leur liaison à l'ADN [64-68]. Ainsi, au niveau cytoplasmique, la liaison du ligand module l'interaction du récepteur avec différents facteurs cytoplasmiques comme les protéines chaperonnes de choc thermique (Hsp, Heat Shock Protein) [69-71] et permet la translocation du récepteur vers le noyau. A l'inverse, en l'absence de ligand, certains récepteurs sont directement liés aux éléments de réponse de leur gène cible [72] et exercent un effet répresseur sur l'expression basale [73, 74].

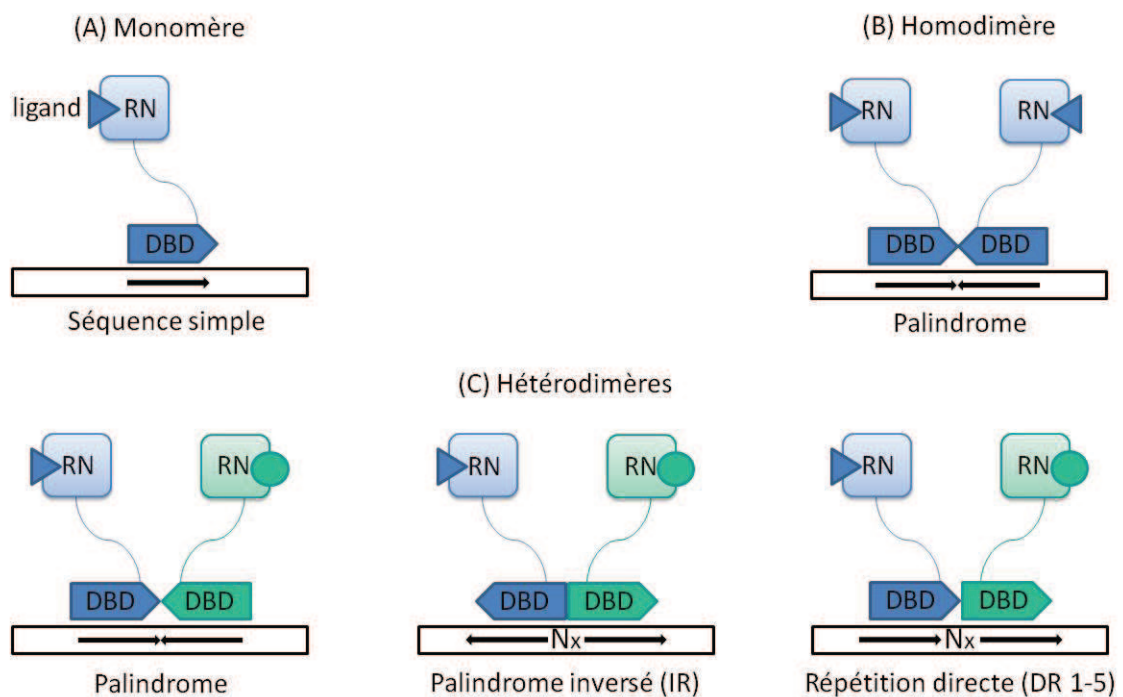
## C. Liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN

Au niveau de l'ADN, les récepteurs se fixent sur des séquences spécifiques de leurs gènes cibles nommées « éléments de réponse » (RE, Response Element ou HRE, Hormone Response Element). La reconnaissance de ce domaine conditionne l'activité du récepteur nucléaire.

Les éléments de réponse sont de courtes séquences d'ADN consensus composées de deux motifs hexamériques organisés en palindrome, répétition directe ou inversée, séparés par un nombre déterminé de nucléotides [4]. La spécificité de reconnaissance est déterminée par trois facteurs : 1) la séquence des deux motifs, 2) leur orientation, 3) le nombre de bases les séparant. Ces séquences se situent dans la région promotrice ou dans la séquence « enhancer » parfois située à plusieurs kilobases en amont du site d'initiation de la transcription. Les récepteurs nucléaires peuvent être regroupés selon leur mode de dimérisation [37]

- **Monomère** : l'élément de réponse de type AGG/TTCA est précédé en 5' d'une région riche en A/T reconnue par la portion C-Terminale du domaine de liaison à l'ADN (boîte A) [75, 76].

- **Homodimère** : concerne majoritairement les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. La surface d'homodimérisation est située au niveau du domaine de liaison à l'ADN (boîte s D et T) [77, 78].
- **Hétérodimère** : le récepteur RXR constitue le principal partenaire d'hétérodimérisation [79]. Certains récepteurs peuvent se lier sous forme d'homodimères, mais la liaison avec RXR accroît leur capacité d'activation de la transcription (cas des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D et à l'acide rétinoïque), il en est de même pour certains récepteurs monomériques comme les récepteurs nucléaires du groupe 4. La polarité de liaison est variable et certains récepteurs peuvent indifféremment lier leur élément de réponse en amont ou en aval de leur partenaire.



**Figure 3 : Mode de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.** Les récepteurs peuvent se lier sur les éléments de réponse de leurs gènes cibles au niveau du domaine de liaison à l'ADN (DBD) sous forme de monomères sur des séquences simples (A), d'homodimères sur des séquences palindromiques (B), d'hétérodimère (C) sur des séquences palindromiques, palindromiques inversées (IR, Inverse Repeat ou répétition inverse) ou des séquences en répétition directe (DR, Direct Repeat ou répétition directe), séparée par un nombre déterminé et spécifique de nucléotides ( $N_x$ ) [37].

## **D. Activation de la transcription des gènes cibles par les récepteurs nucléaires**

La stimulation de l'expression se déroule en trois étapes majeures 1) liaison du ligand, 2) dérégulation et recrutement de co-activateurs, 3) recrutement du complexe transcriptionnel et initiation de la transcription.

### **1. Liaison du ligand**

La liaison du ligand entraîne le passage de la forme inactive à la forme active du récepteur nucléaire [54]. Le ligand se fixe au niveau de la poche hydrophobe (LBP, Ligand Binding Pocket) et induit le repliement de l'hélice 12 provoquant le balancement et la stabilisation du domaine de transactivation AF-2 [56] et de la surface de dimérisation [80-83].

### **2. Recrutement des co-régulateurs**

Les co-régulateurs sont des protéines constituées de multiples motifs courts (RIDs, Receptor Interaction Domains) composés de motifs LxxLL pour les co-activateurs (L : Leucine, x : résidu aminé hydrophobe) [84] et Lxxx/IXXXI/L pour les co-répresseurs (L : Leucine, I : Isoleucine, x : résidu aminé hydrophobe et X : n'importe quel résidu aminé) [85].

De très nombreux co-régulateurs ne cessent d'être décrits [86]. Ils forment des complexes protéiques qui s'associent aux récepteurs nucléaires au niveau du domaine de liaison du ligand et modulent leur activité transcriptionnelle. Les co-activateurs induisent une activité positive alors que les co-répresseurs exercent une activité négative. L'échange entre co-répresseurs et co-activateurs après liaison du ligand est déterminant dans la régulation de la transcription des gènes cibles [87].

#### ***a. Les co-activateurs des récepteurs nucléaires***

Le motif LxxLL adopte une conformation en double hélice amphipathique qui s'apparie à la cavité chargée du domaine de transactivation AF-2 lorsqu'il est en conformation active c'est-à-dire lié au ligand [88-90].

Les co-activateurs représentent une grande famille regroupant plus de cent membres, répartis en quatre groupes principaux [87, 91] :

- **Les complexes de remodelage dépendants de l'ATP** : SWI (mating-type Switching)-SNF (Sucrose Fermentation) et les complexes RSC (Remodeling the Structure of Chromatin) [92],
- **Les co-activateurs à activité histone acétyltransférase** qui permettent la décondensation de la chromatine, la rendant ainsi accessible à la machinerie transcriptionnelle. Trois groupes de protéines sont capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires :
  - Famille des protéines p160 : inclut SRC-1, 2 et 3 (Steroid Receptor Coactivator-1, 2 et 3), [93-104].
  - Famille des protéines p300 ou CBP (cAMP response element-Binding Protein) [91, 100, 105-107] liant le domaine AF-2 et interagissant avec les protéines de la famille p160.
  - Famille des protéines P/CAF (P300/CBP-Associated Factor).
- **Les protéines à activité histone Arginine méthyltransférase** : CARM1 (Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1), PRMT1 (Protein aRginine Methyltransferase 1) et BRG1 (Brahma-related gene 1) [108-113].
- **Les complexes TRAP** (Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein) [114] et DRIP (vitamin D Receptor-Interacting Protein) [115] qui permettent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

A noter que certains co-activateurs sont spécifiques du type cellulaire, de l'état nutritionnel et de l'environnement cellulaire comme PGC1 (PPAR $\gamma$  Co-activator 1) qui permet la liaison de SRC1 [116].

### ***b. Les co-répresseurs des récepteurs nucléaires***

Ils interagissent soit avec les récepteurs nucléaires liés de façon constitutive à l'ADN (notamment les récepteurs TR et RAR) exerçant ainsi un effet répresseur, soit avec les récepteurs liés à des antagonistes ou agonistes partiels qui, du fait de la nature de leur ligand, adoptent une configuration propice à la liaison des co-répresseurs [54]. Le motif LxxxIxxxL adopte une conformation en triple hélice qui occupe la même interface que les co-activateurs sur le domaine de transactivation AF-2 [117].

Les principaux co-répresseurs décrits sont NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor) [73, 74, 118-120].

Ils se lient au niveau de la même région hydrophobe du domaine de liaison du ligand que les co-activateurs par deux motifs analogues de type LXXI/IXXXI/L, nommés RID1 et 2 (Receptor-Interacting Domain 1 et 2) [121]. En revanche, les co-répresseurs n'interagissent pas avec le domaine de transactivation AF-2. Ils permettent le recrutement de larges complexes enzymatiques contenant des histones désacétylases [122-124] et s'opposent à l'activation de la transcription [125].

### ***c. Les co-régulateurs en action : recrutement des complexes de transcription***

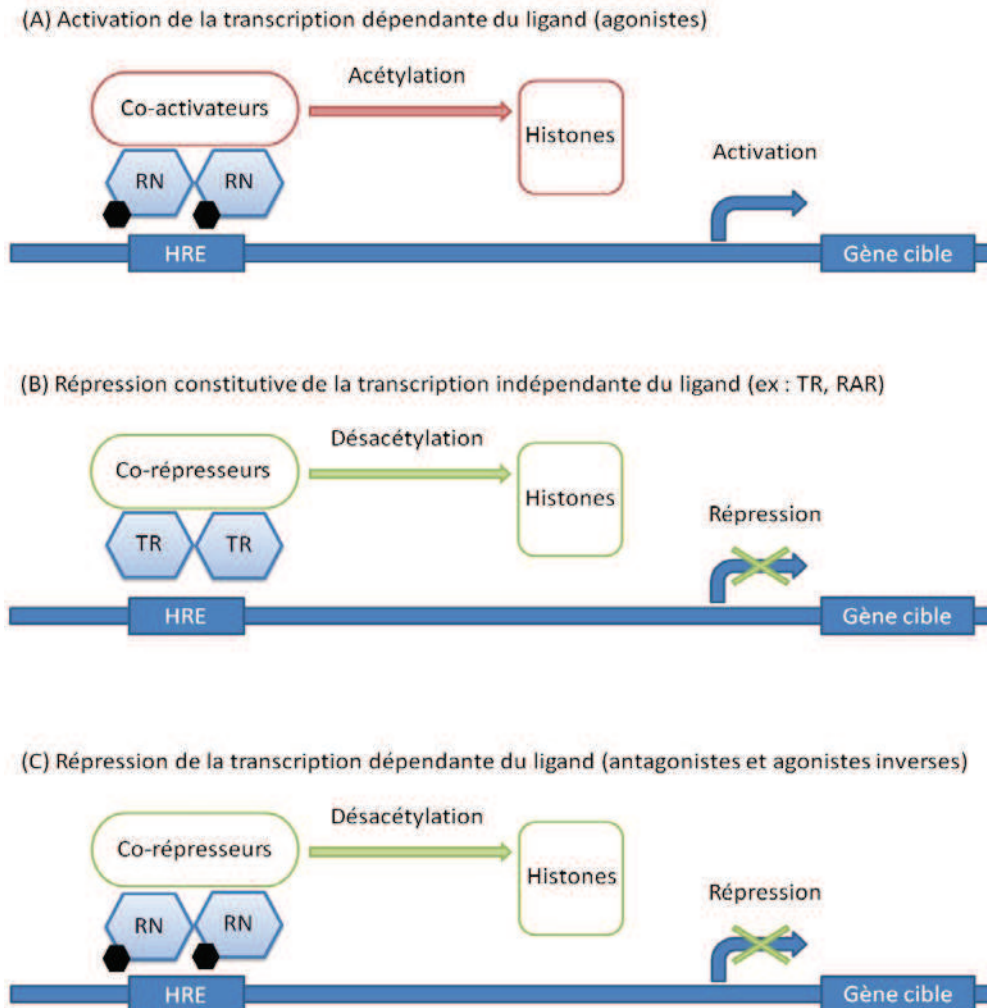
Les co-régulateurs interviennent de façon séquentielle et combinatoire. La liaison du ligand permet le recrutement des co-activateurs qui participent aux modifications de la chromatine qui pourra ainsi lier la machinerie transcriptionnelle. En présence d'antagonistes, la chromatine se condense s'opposant ainsi à l'initiation de la transcription.

Le complexe co-activateur SWI/SNF induit le remodelage de la chromatine, les complexes CBP et p/CAF induisent l'acétylation de la chromatine qui devient accessible à la machinerie transcriptionnelle recrutée par le complexe TRAP/DRIP [64, 126, 127].

En l'absence de ligand ou en présence d'antagoniste ou d'agoniste partiel, les co-répresseurs NCoR et SMRT permettent le recrutement de complexes à activité histone désacétylase qui maintiennent la chromatine sous forme condensée non accessible à la machinerie transcriptionnelle [37, 87].

### 3. Action des récepteurs nucléaires

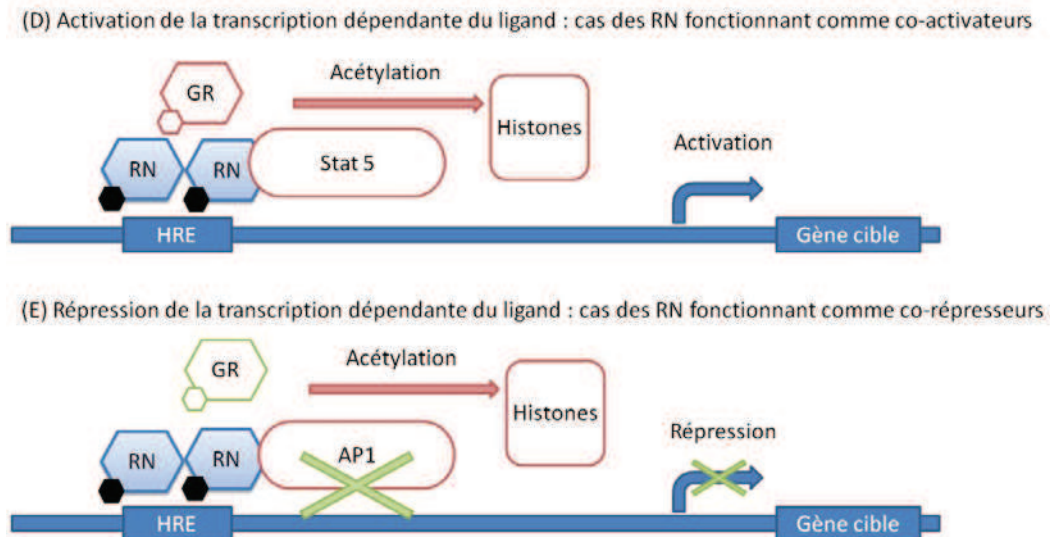
En fonction de la présence de ligands et de leur nature, et par conséquent du type de co-régulateurs recrutés, les récepteurs nucléaires peuvent exercer différents effets sur la transcription de leurs gènes cibles :



**Figure 4 : Activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.** Les récepteurs activent et/ou répriment l'expression de gènes cibles. (A) Activation de la transcription dépendante du ligand, mode d'action typique. (B) Répression constitutive de la transcription indépendante du ligand. Certains sont liés de façon constitutive aux éléments de réponse sous forme d'hétérodimères avec RXR (cas des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et à l'acide rétinoïque) et répriment la transcription des gènes cibles en l'absence de ligand. (C) Répression de la transcription par liaison d'antagonistes/agonistes inverses [45]. RN : Récepteur nucléaire, HRE : Hormone Response Element, TR : Thyroid Receptor.



Certains récepteurs nucléaires peuvent jouer le rôle de co-régulateurs en permettant ou en s'opposant au recrutement d'autres facteurs de transcription comme Stat-5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) ou AP-1 (Activator Protein 1) [128].



**Figure 5 : Exemple de co-régulation par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR).** *Le récepteur activé par son ligand agit comme un co-activateur en liant le facteur de transcription Stat5 (D) ou comme un co-répresseur en inhibant le recrutement du facteur de transcription AP-1 (mécanisme de transrépression) (E). RN : Récepteur nucléaire, HRE : Hormone Response Element, Elément de réponse du gène cible, GR : Glucocorticoid Receptor, Récepteur aux glucocorticoïdes, Stat-5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), AP-1 (Activator Protein 1).*

# CAR, GENERALITÉS

---

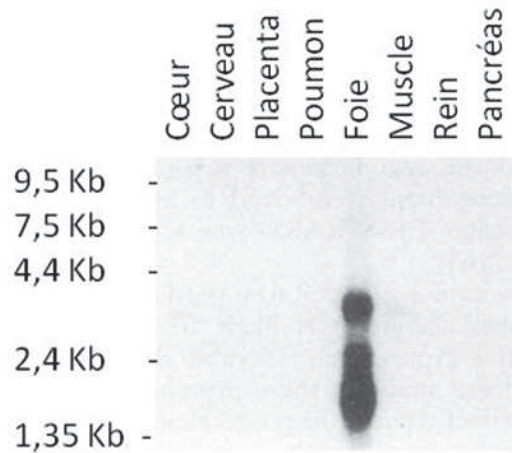
## I. Découverte de CAR

### A. Isolement et caractérisation de CAR

Le récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) a initialement été décrit par Baes et *al.* [21] en tant que récepteur nucléaire orphelin sous le nom de MB67. La découverte de ce nouveau récepteur a été réalisée à partir d'une banque d'ADN complémentaires hépatiques humains par analogie avec une séquence particulière (boîte P) du domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) du récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) et d'autres récepteurs orphelins notamment HNF4 (Hepatic Nuclear factor 4). La détermination de la séquence complète a ainsi permis de le classer comme nouveau membre de la superfamille des récepteurs nucléaires.

MB67 possède ainsi l'une des plus petites séquences de la famille (348 acides aminés) avec une courte séquence N-Terminale mais contient tous les motifs hautement conservés inhérents aux récepteurs nucléaires. Le domaine de liaison au ligand (LDB, Ligand Binding Domain) et le domaine de dimérisation contiennent également trois régions conservées à la fois parmi les récepteurs conventionnels et orphelins. En revanche, la partie C-Terminale associée à l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand (AF-2) est la moins conservée. Ainsi MB67 peut être apparenté au récepteur à la vitamine D (VDR).

MB67 est essentiellement exprimé au niveau hépatique. Les expériences de séparation par Northern blot montrent trois bandes : une bande large de 1,4 à 1,7 kilobases, une à 2,1 kilobases et une troisième à 2,9 kilobases.



**Figure 6 : Distribution tissulaire des ARN messagers de CAR chez l'Homme, distribution analogue chez la Souris [21].**

## **B. CAR, un récepteur à activité constitutive ?**

Afin d'étudier le fonctionnement de ce nouveau récepteur, le domaine de liaison au ligand (LDB, Ligand Binding Domain) supposé a été fusionné avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR $\beta$ ) et co-transfecté avec un plasmide rapporteur contenant dans sa région promotrice un élément de réponse des récepteurs à l'hormone thyroïdienne. Les auteurs ont observé qu'en l'absence de ligand, dans un milieu dépourvu d'hormone thyroïdienne, la construction chimère était capable d'activer le gène rapporteur à hauteur de 60% du taux obtenu en présence de TR $\beta$  et de son ligand. Cette observation fut le premier pas vers la caractérisation de CAR, un récepteur à activité constitutive.

Les auteurs ont ainsi montré d'une part que MB67 est capable de se fixer sur une séquence consensus hexamérique AGGTCA sous forme de répétition directe séparée de cinq nucléotides (DR5) et d'autre part que MB67 est capable de s'associer à RXR pour former un hétérodimère.

## C. Forme murine de CAR

En 1997, Choi et *al.* [129] ont identifié la forme murine de MB67 et l'ont nommé CAR pour Constitutive Androstane Receptor (récepteur constitutif à l'androstane). Le gène codant cette protéine est soumis à un épissage alternatif donnant naissance à deux protéines CAR1 et CAR2. Les deux isoformes comportent un domaine de liaison à l'ADN identique, mais un domaine de liaison du ligand différent.

La forme CAR1 est très proche de MB67 et forme de façon analogue un hétérodimère avec RXR pour se lier au promoteur de RAR au niveau d'une séquence de type répétition directe (DR5) et induit l'expression de RAR en l'absence de rétinoïde ou de ligand exogène. La forme CAR2 correspond à la protéine CAR1 tronquée dans la partie C-Terminale au niveau du domaine de liaison et de dimérisation contenant la région transactivatrice AF-2. Ainsi, CAR2 n'est pas capable de lier l'ADN ni de s'hétérodimériser avec RXR et n'entre pas en compétition avec CAR1. D'autres isoformes ont par la suite été décrites à la fois chez la Souris et le Rat [130]. Les formes murine et humaine partagent un haut degré d'identité de leur séquence au niveau du domaine de liaison à l'ADN, de la charnière, du domaine de liaison du ligand et du domaine d'hétérodimérisation. De la même façon que chez l'Homme, la forme murine CAR1 possède une activité transactivatrice indépendante de la liaison d'un ligand.

## D. CAR, un récepteur nucléaire orphelin adopté

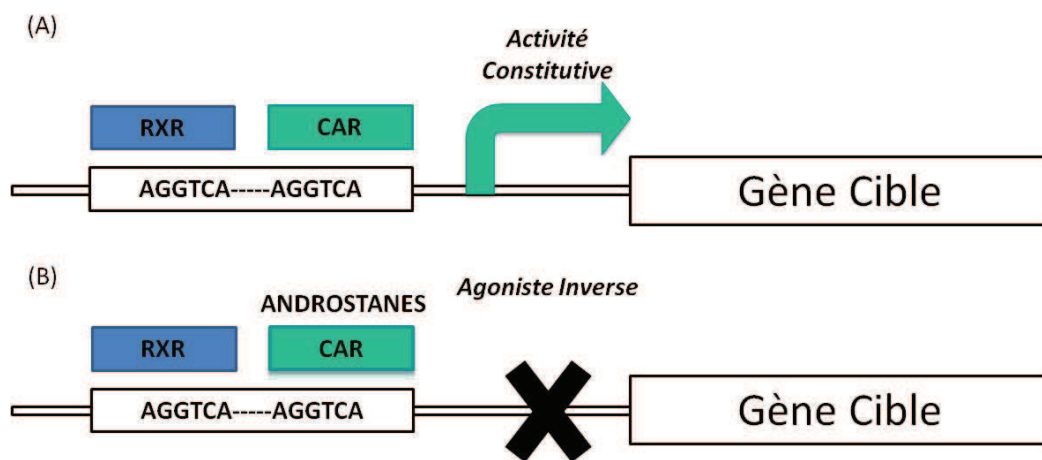
En 1998, Forman et *al.* [131] ont montré que CAR possédait des ligands endogènes, mais que ceux-ci, à l'inverse des agonistes décrits pour les autres récepteurs, bloquaient l'activité de CAR de manière indirecte.

Leurs travaux ont ainsi démontré que CAR était capable, en l'absence de ligand, de recruter les co-activateurs nécessaires à la fonction de transactivation, mais que l'androstanol et l'androsténol, ligands endogènes induisaient la libération des co-facteurs empêchant l'initiation de la transcription. Cependant ils ne s'opposaient pas à l'hétérodimérisation de CAR avec RXR. L'androstanol et l'androsténol furent ainsi décrits comme agonistes inverses.

Dans le cas des récepteurs classiques, la liaison du ligand entraîne un changement de conformation du domaine AF2 qui devient actif [132, 133]. Forman et *al.* [131], en accord avec les travaux précédemment menés, ont montré que le domaine de liaison du ligand, en l'absence de ligand, possédait une conformation active et qu'en présence d'agonistes inverses CAR perdait cette qualité.

Les androstanes ici testés exercent leur action à la concentration de 400nM, qui est supérieure au taux d'androstane circulant chez l'Homme [134]. En revanche, la concentration minimale pour atteindre 50 % de l'inhibition est comparable au niveau d'androstérone présent dans le tissu adipeux [135]. Cette concentration est inférieure à celles décrites pour d'autres récepteurs [136-141]. Ces résultats indiquent que les dérivés de l'androstane pourraient moduler l'activité de CAR.

Ces expériences ont permis de schématiser le mode d'action de CAR en l'absence de ligand et en présence d'agoniste inverse :



**Figure 7 : Mode d'action de CAR.** Le récepteur nucléaire CAR se fixe sous forme d'hétérodimère avec RXR sur des éléments de réponse comportant une répétition de la séquence AGGTCA. En l'absence de ligand (A), CAR active la transcription de ses gènes cibles de manière dite « constitutive ». En présence d'agoniste inverse (B), les androstanes (androstanol et androsténol), l'activité transactivatrice de CAR est inhibée.

## E. CAR, le récepteur au phénobarbital

En 1998, Honkakoski et *al.* [142] ont montré que CAR en association avec RXR était capable d'activer l'élément de réponse au phénobarbital et de stimuler l'expression d'un gène de la famille des cytochromes oxydases 2b (Cyp2b). Le premier gène cible de CAR fut ainsi identifié : Cyp2b10. L'effet activateur du phénobarbital sur CAR a été confirmé par Sueyoshi et *al.* [143] qui ont démontré que l'inhibition de CAR par le 3 $\alpha$ -androsténol était contrebalancée par le phénobarbital. La réponse de CAR au phénobarbital a été étudiée par Kawamoto et *al.* [144]. Les auteurs ont mis en évidence qu'en l'absence de ligand, CAR était présent dans le cytoplasme des hépatocytes primaires et que le phénobarbital induisait la translocation du récepteur dans le noyau.

## II. Structure de CAR

### A. Etude phylogénique

Les récepteurs CAR et PXR dériveraient d'un récepteur ancestral commun [145]. A la différence des mammifères qui possèdent deux récepteurs distincts aux xénobiotiques (CAR et PXR), les poissons et les oiseaux possèdent un récepteur unique (CXR, Chicken X Receptor). CAR appartient à la famille NR1 des récepteurs nucléaires qui regroupe les récepteurs PXR, LXR, TR, PPAR, ROR, Rev-erb alpha, VDR et FXR. Les récepteurs CAR, PXR et VDR composent le sous-groupe NR1I [146]. A l'exception de CAR qui n'a été détecté que chez les mammifères, les autres membres de la famille NR1I (VDR et PXR) sont présents parmi de nombreuses autres espèces.

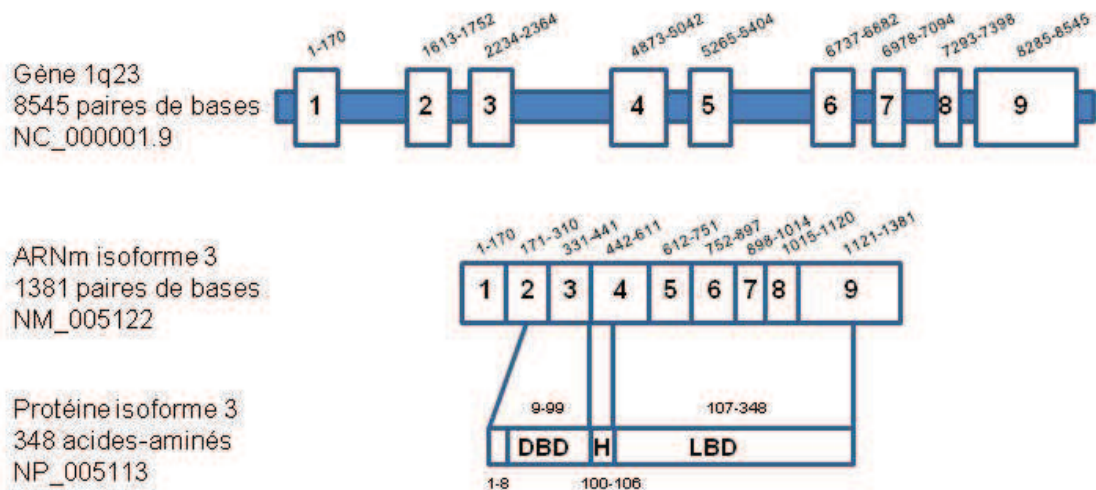
### B. CAR, du gène à la protéine

La forme humaine de CAR est le produit du gène NR13, localisé sur le chromosome 1 locus 1q23, mesurant 8,5 Kilobases. La séquence de CAR est composée de 8545 paires de base et comprend 9 exons, séparés par 8 régions introniques [147, 148]. Les exons 2 à 9 contiennent la région codante (soit 348 acides aminés) et est en réalité plus courte que l'ADN complémentaire isolé par Baes et *al.* en 1994 [21].

La séquence primaire de CAR présente 43% d'homologie avec PXR, 34% avec VDR et moins de 30% avec les autres récepteurs nucléaires [149]. Jusqu'à vingt-deux variants de la forme humaine de CAR ont été décrits, correspondant à différentes combinaisons d'épissage [147, 148, 150-152]. De nombreux transcrits ont été identifiés dans le foie, alors qu'une seule isoforme est présente au niveau de l'intestin. L'isoforme 3 de longueur complète est considérée comme l'isoforme naturelle. Certaines isoformes résultant de mutations non-sens sont rapidement dégradées. Certains variants présentent des propriétés de liaison à l'ADN, de transactivation et de liaison de co-activateurs diminuées [147]. Certaines isoformes comportent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine AF-2 intacts, mais sont incapables de lier un élément de réponse et d'activer la transcription du fait d'une anomalie de conformation tridimensionnelle [148].

La découverte de ces nombreux variants pose les questions suivantes :

- Ces isoformes sont-elles présentes chez tous les individus ?
- Le ratio peut-il être influencé par des facteurs endogènes et la stimulation par les xénobiotiques ?
- Certaines isoformes sont-elles spécifiques de certains ligands ?



**Figure 8 : Organisation du gène humain codant le récepteur CAR, ARN messager et protéine.** Chez l'Homme, le gène codant CAR est localisé sur le chromosome 1, composé de 9 exons et 8 introns. Vingt-deux isoformes résultant de différentes combinaisons d'épissage ont été recensées. L'isoforme 3 est considérée comme la forme naturelle. Elle code une protéine de 348 acides aminés. Le domaine de liaison à l'ADN est codé par les exons 2 et 3, le domaine charnière (H) par une partie de l'exon 4 et le domaine de liaison du ligand par les exons 4 à 9 [153].

## C. Domaine de liaison à l'ADN de CAR

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) intervient dans la liaison spécifique à l'ADN et les phénomènes de dimérisation [154]. Il se présente sous forme globulaire et contient deux hélices alpha perpendiculaires (hélice 1 et 2), une boucle de connexion (région T) perpendiculaire à l'axe de l'ADN et une longue hélice alpha (hélice A). CAR interagit avec l'élément de réponse de l'ADN grâce à l'hélice 1, l'hélice 2 effectuant moins de contacts ainsi que la région T et l'hélice A [155].

Les éléments de réponse de CAR sont organisés :

- **sous forme de groupe** (PhénoBarbital Responsive Enhancer Modules PBREM). Par exemple, chez la Souris l'élément de réponse du gène codant Cyp2b10 contient deux répétitions directes de type DR4 appelées NR 1 et 2 (Nuclear Receptor 1 et 2) [142],
- **sous forme simple de répétition** directe (DR, Direct Repeat) ou inversée (IR, Inverted Repeat).

CAR est capable de reconnaître différents types d'élément de réponse. Ces séquences peuvent être spécifiques de CAR ou communes à d'autres récepteurs nucléaires.

**Tableau 1 : Eléments de réponse reconnus par CAR** (DR : Direct Repeat, IR : Inverted Repeat, PBREM : Phenobarbital Response Element Module).

ELEMENTS DE REPOSE	GENES CIBLES	REFERENCES
<b>DR4</b>	Cytochromes oxydases (Cyp2c29 et Cyp2b1) Inducible Nitric Oxide Synthase (iNos)	[156-163]
<b>IR6</b>	Cytochromes oxydases (Cyp2b6 et Cyp3a5)	[164, 165]
<b>IR8</b>	Multidrug Resistance-associated Protein 2 (Mrp2) Cytochromes oxydases (Cyp1a1 et 1a2)	[166, 167]



<b>DR1</b>	Cytochromes oxydases (Cyp7a1) Acyl-CoA OXidase (Aox)	[168, 169]
<b>DR3</b>	Cathepsine 3 Cytochromes oxydases (Cyp3a4 et Cyp3a1)	[161, 170-173]
<b>DR5</b>	Cytochrome oxydase (Cyp2c9)	[21, 129, 172-174]
<b>DR2</b>	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	[175]
<b>PBREM</b>	Cytochromes oxydases (Cyp2b10 et Cyp2b6)	[142, 160]

## D. Domaine de liaison au ligand de CAR

Il s'agit du domaine le moins conservé parmi les différentes espèces. La forme murine de CAR présente 94% d'homologie avec la forme humaine, mais seulement 70% au niveau du domaine de liaison du ligand, ce faible degré d'homologie est retrouvé également avec de très nombreuses espèces [176].

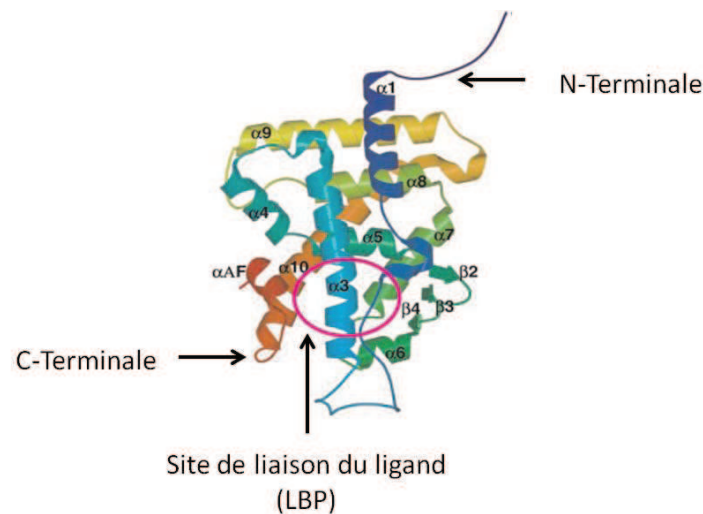
La poche de liaison du ligand (LBP) est circonscrite par 34 résidus aminés, situés sur la troisième hélice (H3). Globalement hydrophobe, cette cavité a une taille moyenne de 500 Angström [154, 177, 178] contre environ 1200 pour la forme humaine de PXR et 990 pour VDR.

La structure secondaire du domaine de liaison du ligand a été décrite par comparaison avec le récepteur PXR et partage les déterminants constitutifs des autres récepteurs. Il est formé de :

- **10 hélices alpha** : alpha 1 à 10, deux hélices supplémentaires entre les hélices 1 et 3 (alpha2' et 2'') et alpha 3' entre alpha3 et 4,
- **une hélice alpha AF-2** correspondant au domaine de transactivation dépendant du ligand,

- **une hélice simple tour Hx** entre l'hélice 10 et le domaine de transactivation AF-2, constituée de 4 résidus aminés, conservée entre les orthologues de CAR chez les mammifères [176],
- **cinq feuillets bêta** : B1 et B1', B2, B3 et B4 [149, 179, 180].

L'étude de l'alignement des séquences et l'analogie avec les autres récepteurs nucléaires déjà décrits ont permis de modéliser le domaine de liaison du ligand de CAR [149].



**Figure 9 : Modèle structural du domaine de liaison du ligand de la forme humaine de CAR.** La partie N-Terminale est colorée en bleu et la partie C-Terminale en rouge. Les éléments de la structure secondaire sont dénombrés selon la structure de la forme humaine de PXR. Le site de liaison du ligand (LBP, Ligand Binding Pocket) est représenté par le cercle rose [179].

## E. Déterminants fonctionnels de CAR

### 1. Hétérodimérisation de CAR avec RXR

CAR s'hétérodimérise avec le récepteur RXR dans le sens tête-à-queue au niveau du domaine de liaison au ligand, ce qui favorise la stabilisation de l'hétérodimère. Bien que CAR et RXR interagissent au niveau de séquences communes aux autres récepteurs (type xKxx, x : n'importe quel acide aminé et K : Lysine), l'arrangement entre les deux partenaires présente des particularités ; notamment une plus large interface de dimérisation et une orientation différente des hélices 7 et 10 formant un angle particulier entre les deux récepteurs [179].

## 2. Liaison du ligand sur CAR

### *a. Liaison du TCPOBOP*

Le TCPOBOP (3,3',5,5'-Tétrachloro-1,4-bis (pyridyloxy)benzene) est un agoniste spécifique de la forme murine de CAR [181]. Lié à son récepteur, il est étroitement enfermé dans le domaine de liaison du ligand. Cette molécule présente 3 cycles (A, B et C), prend la forme d'un C, centré au cœur de la cavité de liaison du ligand. Le cycle A est orienté vers les feuilletts  $\beta$ . Le cycle B vers l'hélice 10 et le domaine de transactivation AF-2 et établit des interactions hydrophobes. Le cycle C interagit directement avec le domaine AF-2 et l'hélice de liaison (Hx) pour stabiliser AF-2 [154]. La spécificité de CAR pour le TCPOBOP réside donc dans son domaine C-Terminal [182].

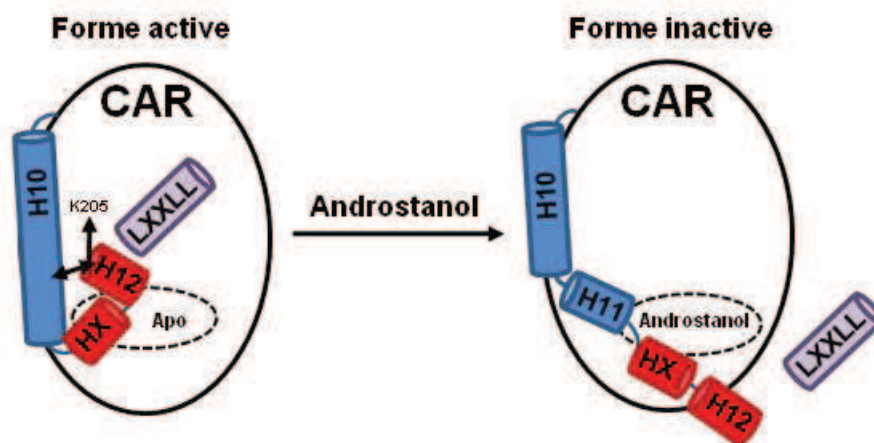
### *b. Liaison du CITCO et des dérivés prégnanediones*

Le CITCO (6-(4-chlorophényl)imidazo[2,1-b][1,3]-thiazole-5-carbaldéhyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) est un agoniste spécifique de la forme humaine de CAR [183]. La liaison s'effectue au niveau du domaine de liaison du ligand [179]. Les dérivés prégnandiones ne présentent pas un pouvoir activateur comparable au TCPOBOP chez la Souris et induiraient quant à eux peu de changements conformationnels du domaine de liaison du ligand.

Les résidus impliqués dans la spécificité de reconnaissance de la forme humaine appartiendraient au moins en partie à l'hélice 3 [177]. Il existe une différence de dix acides aminés au niveau de la poche de liaison du ligand de l'Homme et de la Souris. La forme humaine mesure 675 Angström contre environ 500 Angström chez la Souris à l'origine de la spécificité de reconnaissance du ligand.

### *c. Désactivation de l'activité basale de CAR*

L'agoniste inverse de CAR, l'androstanol présente un noyau stéroïde lui conférant une conformation plus compacte que le TCPOBOP. La molécule n'occupe pas tout l'espace de la poche de liaison du ligand, ce qui induit le relâchement de l'hélice 10 et le repositionnement du domaine de transactivation AF-2 [178, 180]. Les co-activateurs sont alors libérés et les co-répresseurs recrutés.



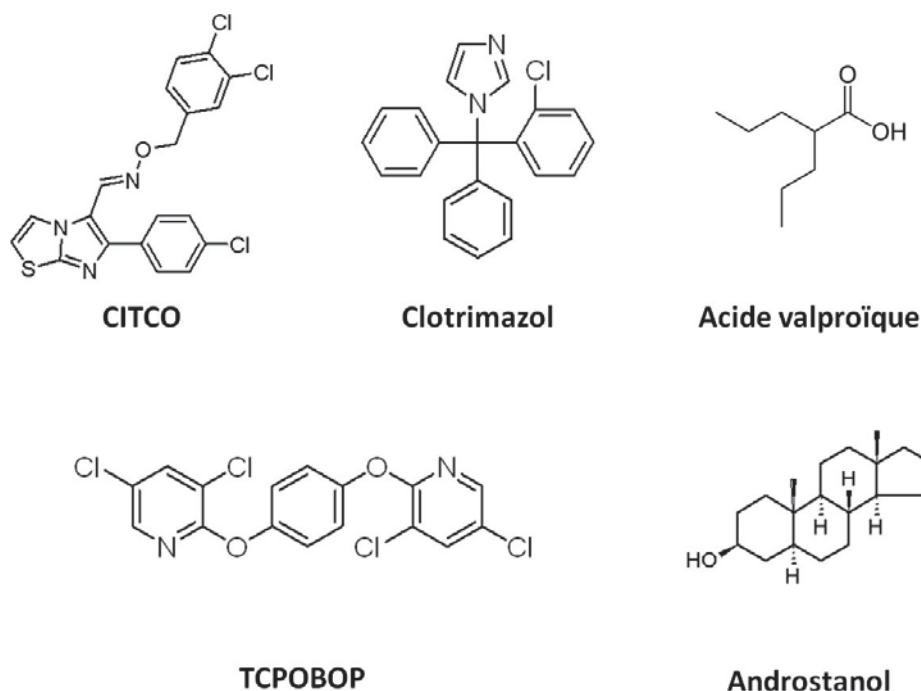
**Figure 10 :** Représentation schématique du passage de la forme active à la forme inactive de CAR en présence de son agoniste inverse, l'androstanol. Sous forme active (Apo), l'hélice 12 est stabilisée grâce à l'hélice X et les liaisons avec les hélices 4 (K205) et 10 (S337) [154, 179], ce qui permet la liaison des co-activateurs par leurs domaines LxxLL (L : Leucine, x : n'importe quel acide aminé). La liaison de l'androstanol induit l'effondrement de la poche formée par les hélices 12 et X, induisant la libération des co-activateurs [184].

### 3. Interaction de CAR avec ses co-régulateurs

L'étude de la séquence primaire de CAR montre que le domaine formé par l'hélice 12 et le domaine de transactivation AF-2 est conservé ainsi que la surface d'interaction avec les co-régulateurs [180]. A l'état basal, CAR ne lie pas de co-répresseur comme les autres récepteurs. La fixation des co-régulateurs dépend donc de la présence d'agonistes particuliers comme par exemple :

- **le CITCO**, non seulement, stimule le recrutement de co-activateurs mais aussi de co-répresseurs,
- **le clotrimazol**, antagoniste, réduit la liaison des co-activateurs mais aussi celle des co-répresseurs,
- **l'acide valproïque** s'oppose à la liaison de histones désacétylases avec CAR et favorise le recrutement du co-activateur SRC-1 [185],

- **seul le TCPOBOP** qui stimule chez la Souris le recrutement de co-activateurs et diminue celui des co-répresseurs peut être considéré comme un agoniste « vrai »; alors que l'androstanol, agoniste inverse, diminue le recrutement des co-activateurs et augmente celui des co-répresseurs [186].



**Figure 11 : Structure chimique de différents ligands du récepteur nucléaire CAR.** *CITCO, 6-(4-chlorophényl) imidazo [2,1-b] [1,3]- thiazole-5- carbaldéhyde -O- (3,4-dichlorobenzyl)oxime, TCPOBOP, 3,3',5,5'-Tétrachloro-1,4-bis (pyridyloxy)benzene.*

### *a. Les co-activateurs de CAR*

Les co-activateurs permettent d'une part l'initiation de la transcription, mais également la translocation nucléaire de CAR [187]. La liaison des co-activateurs dans le cas de CAR est possible en l'absence de ligand et cette liaison est alors renforcée en présence du ligand [155]. La surface d'interaction met en jeu les hélices 3 et 4, le domaine de transactivation AF-2 et la conformation en double hélice des co-activateurs. Le domaine de liaison du ligand lie les motifs LxxxxxxLL (L : Leucine et x : n'importe quel acide aminé) des co-activateurs, notamment :

- **les protéines de la famille p160** notamment **SRC-1p1** (Steroid Receptor Coactivator 1p1), **GRIP1** (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1) [180, 188-191],
- **TIF2** (Transcriptional Intermediate Factor 2) [154, 155],
- **ASC-2** (Activating Signal Cointegrator-2) et **PPRIP** (Peroxisome Proliferator-activated Receptor binding Protein) [192, 193].

### *b. Les co-répresseurs de CAR*

Les séquences des co-répresseurs impliquées dans la liaison à CAR sont les mêmes que pour les autres récepteurs. Il s'agit d'une séquence de type I/LXXXXXXI/V-I (I : Isoleucine, L : leucine, X : n'importe quel acide aminé et V : Valine) [194], [195].

Le récepteur SHP (Small Heterodimer Partner) inhibe le recrutement des co-activateurs et recrute directement des co-répresseurs, s'opposant ainsi à l'activité de CAR [196]. A noter, la découverte d'un nouveau co-répresseur ; SMILE (SMall heterodimer partner Interacting LEucine zipper protein) impliqué dans le contrôle direct de CAR mais aussi du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et de HNF4 (Hepatic Nuclear Factor 4) par compétition avec les co-activateurs et le recrutement des histones désacétylases [197].

## **4. Bases de l'activité constitutive de CAR**

Bien que relativement proche des autres récepteurs, le domaine de liaison du ligand de CAR (LBD, Ligand Binding Domain) possède des résidus aminés et des motifs particuliers lui conférant une conformation originale proche de la conformation active des autres récepteurs appariés à leurs propres ligands. Ainsi, en l'absence de ligand, CAR est capable de lier des co-activateurs et cette liaison peut alors être renforcée par la présence d'agonistes [198].

- **une courte boucle entre l'hélice 10 et le domaine AF-2** : l'hélice Hx qui rapproche AF-2 des hélices 3 et 10, l'orientant en conformation active,
- **une courte hélice AF-2** qui permet à l'extrémité C-Terminale du domaine de liaison du ligand d'interagir avec les hélices 4 et 10 [180],

- **une hélice 2** (alpha 2' et 2'') plus longue qui rapproche l'hélice 3 et la rigidifie,
- **des interactions hydrophobes** qui stabilisent l'hélice 12 grâce à certains acides aminés spécifiques de CAR au niveau des hélices 3, 4, 11 et 12, non retrouvés parmi les autres récepteurs nucléaires [154, 155],
- **une particularité de la séquence des hélices 6 et 7** de la forme murine CAR1 dont la mutation induit une perte de l'activité constitutive [179]. L'insertion à ce niveau de quatre résidus amino-acides comme dans l'isoforme CAR2 aboutit également à une perte d'activité [172]. Cette propriété fait de CAR2 un récepteur dépendant du ligand à la différence de CAR1 [199].

A l'inverse des propriétés énoncées ci-dessus, l'isoforme 3 de la forme humaine de CAR exprimée de façon constitutive dans la lignée HepG2, dispose de cinq acides-amino dans le domaine de liaison du ligand lui conférant une faible activité basale et une forte capacité d'inductibilité [200].

## 5. Localisation cellulaire et translocation de CAR

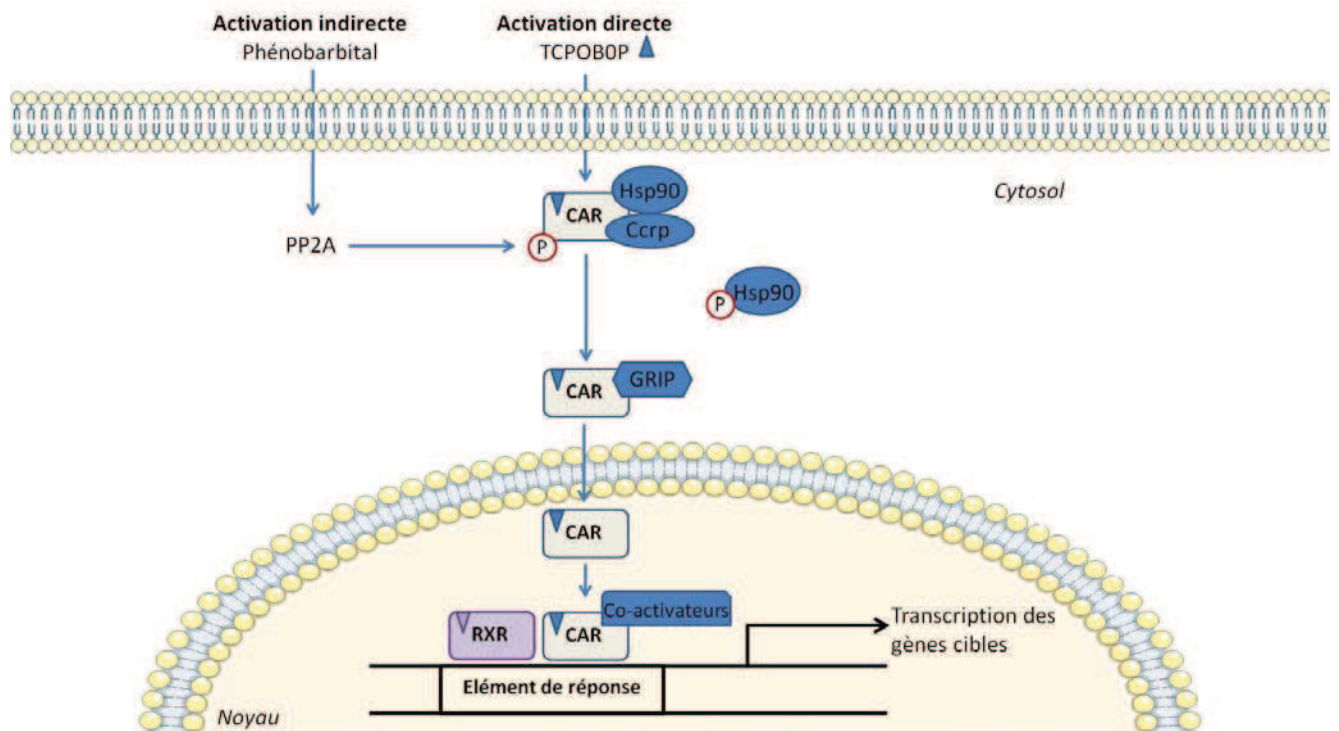
A l'état basal, le récepteur CAR est présent au niveau cytosolique dans les cellules hépatiques primaires [144] et se localise dans le noyau lorsqu'il est activé. En revanche, dans les lignées cellulaires immortalisées (comme la lignée hépatique Hep G2), CAR est directement présent au niveau du noyau à l'état basal [21, 201, 202].

### a. Phénomènes de phosphorylation

Dans le cytoplasme, CAR est retenu par un complexe protéique impliquant la protéine de choc thermique Hsp 90 (Heat Shock Protein) [203], la protéine Ccrp (Cytoplasmic CAR Retention Protein) [204] et Pp1r16a (sous-unité de la Protéine Phosphatase 1 bêta) [205]. La translocation nucléaire nécessite le recrutement de la phosphatase 2A (PP2A) [144, 203, 206], responsable de la déphosphorylation des complexes de rétention cytoplasmique.

Koike et *al.* [207] ont montré que CAR est également capable de gagner la membrane cellulaire de façon dose-dépendante en réponse au phénobarbital. Bien que CAR ne possède pas de séquence-type d'ancrage à la membrane, il semble être co-localisé à la membrane avec

la protéine d'ancrage Pp1r16a, inhibant l'activité de la protéine phosphatase 1b, inhibiteur de la translocation de CAR [205].



**Figure 12 : Activation et translocation du récepteur nucléaire CAR.** Deux mécanismes sont impliqués dans la stimulation de la translocation de CAR : mécanisme direct par liaison du TCPOBOP au domaine de liaison du ligand et mécanisme indirect par induction de la phosphatase 2A (PP2A) par le phénobarbital [208]. Le récepteur CAR est retenu dans le cytoplasme par les protéines Hsp90 et Ccrp, la stimulation de CAR par le TCPOBOP ou le phénobarbital induit la translocation de CAR et la liaison du co-activateur GRIP1. CAR lie l'élément de réponse de son gène cible et induit la transcription.

Les phénomènes de phosphorylation sont primordiaux dans le trafic intracellulaire de CAR ; ainsi, la rétention de la forme humaine de CAR est dépendante de la phosphorylation du résidu thréonine 38 (thréonine 48 pour la forme murine) par la protéine kinase C [209]. Le phénobarbital induit une déphosphorylation du résidu thréonine et provoque la translocation de CAR. La sérine 202 serait également un site privilégié de phosphorylation [210].



### *b. Autres cascades de phosphorylation*

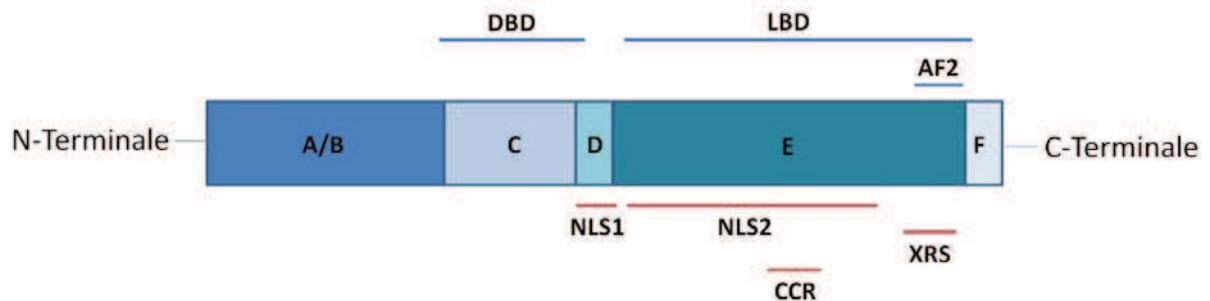
La cascade Mek (Mitogen-activated protein kinase Kinase)-Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase) a également été mise en évidence dans la régulation de la translocation de CAR. Durant la prolifération cellulaire hépatique, l'expression du facteur HGF (Hepatic Growth Factor) diminue l'expression des enzymes de détoxification [211] et s'oppose à l'activation de la transcription par CAR induite par le phénobarbital ou le TCPOBOP [212]. En fait, HGF active Mek qui phosphoryle Erk, qui à son tour s'oppose à la translocation nucléaire de CAR et à l'induction de l'expression de Cyp2b10 par le TCPOBOP ou le phénobarbital. A l'inverse, les inhibiteurs de la phosphorylation de Erk induisent la translocation de CAR [213-215].

### *c. Domaines de CAR impliqués dans le trafic subcellulaire*

Les régions spécialisées dans la translocation de CAR sont :

- **le domaine XRS** (Xenobiotic Response Sequence) de reconnaissance des xénobiotiques, domaine spécialisé appartenant au domaine de liaison du ligand,
- **le domaine de transactivation AF-2** dont la mutation réduit l'accumulation induite par le co-activateur GRIP1 [216],
- **le domaine NES** (Nuclear Export Signal) identifié dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'autres récepteurs [217], dont la séquence correspondante chez CAR comporte deux résidus phénylalanines conservés [216, 218], participerait à l'export de CAR du noyau vers le cytoplasme en l'absence de traitement ou pour mettre fin à l'activation,
- **les domaines de localisation nucléaire NLS** (Nuclear Localization Signal) sont des séquences d'adressage responsables du transport des protéines [219]. Deux domaines NLS ont été identifiés dans la séquence de CAR : NLS 1 dans la région charnière (conservé parmi les espèces) et NLS 2 dans le domaine de liaison du ligand [218, 220, 221]. Kanno et *al.* [222] ont montré que CAR pénètre dans le noyau grâce à un système de type importine/RAN-GTP liant le domaine de liaison du ligand de CAR au niveau de la séquence NLS2,

- **la séquence de rétention cytoplasmique CCR** (Cytoplasmic Retention Region) qui serait un site de liaison potentiel pour la protéine Ccrp (Cytoplasmic Retention Region Protein) au niveau du domaine de liaison du ligand [220].



**Figure 13 : Illustration schématique des domaines fonctionnels de CAR chez le Rat intervenant dans le trafic subcellulaire du récepteur.** *Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) ne possède pas de séquence d'adressage. Les domaines intervenant dans la localisation de CAR sont situés dans la région charnière D (NLS1, Nuclear Localization Signal 1) et dans le domaine de liaison à l'ADN ou DBD, DNA Binding Domain (NLS2, Nuclear Localization Signal 2 ; XRS, Xenobiotic Response Sequence ; CRR, Cytoplasmic Retention Region) [220].*

Les protéines de rétention cytoplasmique sont amarrées dans le cytoplasme au sein d'un réseau de microtubules qui interviendrait également à la localisation de CAR. Ainsi, les inhibiteurs des microtubules comme la colchicine et le nocodazole [223, 224] s'opposent à la stimulation de l'expression des cytochromes oxydases de la famille 2b par le phénobarbital en inhibant la translocation de CAR dans les cultures primaires de foie de Rat [225] et en interférant avec la cascade GR-CAR dans les cultures primaires de foie humain [226, 227].

## 6. Expression de CAR

### a. Expression tissulaire de CAR

CAR est fortement exprimé dans les hépatocytes péri-veineux et la vésicule biliaire [228], les cellules épithéliales de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et à plus faible niveau dans le cœur, le muscle squelettique, le cerveau, les reins et les poumons [21, 129, 208, 229]. En revanche, CAR est pratiquement indétectable dans le tissu adipeux où le traitement par phénobarbital n'induit pas les cibles de CAR [230, 231].

### *b. Différences liées au sexe*

En relation avec la répression de l'activité de CAR par l'androstanol (métabolite de la testostérone), Ledda-Columbano et *al.* [232] ont montré que les souris femelles répondent plus efficacement au TCPOBOP que les mâles. Cet effet semble indépendant de différences de pharmacocinétique [233]. Il en est de même pour la réponse au phénobarbital [234-237]. D'autre part, l'œstradiol active CAR [238] et semble influencer le taux d'expression de CAR chez les femelles [239].

Ces différences d'expression existent également chez les rats Wistar-Kyoto [240], chez lesquels les cytochromes oxydases de la famille 3 (responsables de l'hydroxylation de la testostérone) ne sont pas activées par le TCPOBOP uniquement chez les femelles [241]. L'expression de CAR et son activation seraient donc adaptées au statut hormonal [242].

## **7. Ligands et modulateurs de CAR**

Deux types de molécules sont susceptibles d'induire ou de réprimer l'activité transcriptionnelle de CAR :

- **les ligands purs** comme le TCPOBOP chez la Souris [181] et le CITCO chez l'Homme [183] qui lient le domaine de liaison du ligand, ainsi que l'agoniste inverse : l'androstanol [131],
- **les activateurs ne liant pas CAR** comme le phénobarbital [144] mais induisant sa translocation nucléaire.

A présent, de très nombreux activateurs de CAR ont été identifiés, sans pour autant que la liaison spécifique ait pu être mise en évidence. CAR est principalement considéré comme un récepteur aux molécules exogènes (xénobiotiques), mais il est également impliqué dans la reconnaissance de molécules endogènes (*cf.* Tableau 3 page 54).

## 8. Relations entre CAR et les autres récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires régulent de nombreuses voies métaboliques par une action propre au niveau de leurs gènes cibles mais forment également un système redondant de régulation. CAR et ses récepteurs apparentés participent ainsi à des voies de régulation communes.

Les déterminants de ces interrelations sont :

- **des ligands communs** générant des phénomènes de compétition,
- **la présence d'éléments de réponse communs** à l'origine d'une compétition au niveau des gènes cibles,
- **le recrutement de co-facteurs** qui soit court-circuitent l'activation de CAR ou au contraire facilitent le recrutement secondaire de CAR (facilitation),
- **la stimulation ou la répression de CAR** via un autre récepteur nucléaire.

**Tableau 2 : Interrelations entre CAR et ses récepteurs apparentés** (*PXR, Pregnane X Receptor ; GR, Glucocorticoïde Receptor ; AHR, Aryl-Hydrocarbon Receptor ; HNF4, Hepatic Nuclear Factor 4 ; PPAR $\alpha$ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  ; RAR, Retinoic Acid Receptor ; ER, Estrogen Receptor ; LXR, Liver X Receptor*).

RCEPTEURS	EFFETS COMMUNS
<b>CAR et PXR</b>	Partagent des éléments de réponse communs au niveau des mêmes gènes cibles [161, 162]
<b>CAR et GR</b>	<p>Cibles communes : Cyp2c9 [243]</p> <p>Ligands communs : dexaméthasone active le récepteur aux glucocorticoïdes mais aussi l'activité transcriptionnelle de CAR et l'expression de ses gènes cibles [226]</p> <p>Régulation directe : présence d'un élément de réponse au récepteur aux glucocorticoïdes sur le promoteur humain de CAR [244]</p>

<b>CAR et AHR</b>	Ligands communs : stimulation de l'expression de CAR en réponse aux agonistes du récepteur AHR, [245]
<b>CAR et HNF4</b>	Facilitation : HNF4 permet l'induction par CAR [246-249] Régulation directe : HNF4 régule positivement l'expression de CAR dans le foie en développement [250, 251] Compétition : CAR entre en compétition avec HNF4 au niveau du recrutement des co-activateurs et s'oppose à l'activité lipogénique et glucogénique de HNF4 [168] Compétition au niveau d'éléments de réponse communs (Cyp7a1, 8b1, phosphoenolpyruvate kinase) [168]
<b>CAR et PPAR<math>\alpha</math></b>	Ligands communs : les fibrates se comportent comme des agonistes inverses de CAR [252], les phtalates ligands de PPAR $\alpha$ exercent également leurs effets indépendamment de PPAR $\alpha$ par liaison avec CAR [253] Régulation directe : CAR possède un élément de réponse à PPAR [254, 255] Cibles communes : CAR reconnaît l'élément de réponse de l'Acyl-Coenzyme A Oxydase ( <i>Aox</i> ), cible de PPAR $\alpha$ [169]
<b>CAR et RAR</b>	Régulation directe : le promoteur humain de CAR possède un élément de réponse à RAR [256]
<b>CAR et ER</b>	Compétition : CAR s'oppose à l'effet transcriptionnel du récepteur aux œstrogènes par compétition au niveau du recrutement de ses co-activateurs [257]
<b>CAR et LXR</b>	Compétition au niveau des mêmes éléments de réponse : LXR lie les éléments de réponse des Cyp2h1 et 2b6 et peut s'opposer à l'action de CAR [258] Sulfatation et inactivation des oxystérols ligands endogènes de LXR par induction des enzymes de détoxification par CAR [259]

### III. Rôles de CAR

Les hommes et les animaux sont exposés à de nombreux produits chimiques potentiellement toxiques aussi bien d'origine exogène (xénobiotiques) qu'endogène (endobiotiques). Les xénobiotiques regroupent tous les composés de l'environnement extérieur : polluants, toxines, mais aussi les médicaments et les composés d'origine alimentaire. Les endobiotiques regroupent de nombreux intermédiaires métaboliques comme les lipides et leurs dérivés (cholestérol et oxystérols, acides biliaires, hormones stéroïdes et acides gras et les médiateurs de l'inflammation).

L'ensemble de ces composés est essentiellement de nature lipophile. Ils traversent la membrane et peuvent s'accumuler dans les cellules jusqu'à un niveau toxique. Différents systèmes de détoxification sont alors mis en œuvre afin de protéger la cellule : il s'agit de réactions de biotransformation générant des dérivés hydrophiles qui seront transportés et excrétés. Ces réactions sont coordonnées par l'action conjointe et parfois redondante des récepteurs nucléaires, notamment le récepteur CAR, son récepteur apparenté PXR [260], ainsi que le récepteur HNF4 [261].

Bien que CAR soit essentiellement décrit pour son rôle en tant que xénosenseur, il apparaît également comme un acteur majeur du métabolisme de différentes substances endogènes.

## **A. CAR et catabolisme des xénobiotiques**

Le rôle de CAR dans le métabolisme des xénobiotiques a initialement été mis en évidence par l'étude de l'élément de réponse au phénobarbital situé dans la région promotrice des cytochromes oxydases.

Les cytochromes oxydases forment un système complexe de détoxification hépatique responsable des étapes initiales de transformation des composés lipophiles (réactions de phase I) [262]. Ces enzymes catalysent des réactions d'oxydation, de peroxydation et de réduction de nombreux composés endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires, les acides gras, les prostaglandines et leucotriènes ainsi que le rétinol [263, 264]. Elles sont non seulement essentielles pour la vie des eucaryotes et la biosynthèse des stérols et donc des membranes mais elles jouent également un rôle primordial dans le catabolisme des xénobiotiques.

Chez l'Homme, sur les cinquante-sept enzymes composant la famille des cytochromes oxydases P450, quinze sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Les cytochromes oxydases catalysent la biotransformation de composés pharmacologiques en catabolites actifs pouvant être toxiques, il en est de même pour des produits pro-carcinogènes [265]. L'ensemble de ce système fait l'objet de nombreuses régulations.

Du fait de leur rôle dans le catabolisme des composés exogènes, le niveau d'expression basal des cytochromes oxydases est relativement faible en l'absence de substrat mais fortement inductible en présence d'inducteurs enzymatiques. L'inducteur le plus étudié est le phénobarbital qui stimule un grand nombre de cytochromes oxydases [266]. Cet effet a été décrit pour la première fois dans les années 1960 [267-269].

L'élément de réponse au phénobarbital est composé de deux séquences de type répétition directe (DR4) nommées NR1 et 2. Honkakoski et *al.* [142] ont alors montré que CAR était capable de lier NR1 et d'activer la cytochrome oxydase 2b10 en réponse au phénobarbital. En revanche, NR2 ne semble pas impliqué dans la réponse de CAR au phénobarbital. Dès lors, de nombreuses études ont permis d'identifier de nouveaux agonistes et activateurs de CAR.

**Tableau 3 : Modulateurs de l'activité de CAR chez l'Homme et la Souris.** Deux classes principales de xénobiotiques sont décrites (polluants et médicaments), les dérivés d'origine alimentaires forment un groupe minoritaire. Les molécules étudiées peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur bien que leur mode d'action ne soit pas clairement identifié.

MOLECULES	MODELES	ACTION	MECANISMES	REFERENCES
<b>POLLUANTS</b>				
<b>TCPOBOP</b>	Souris	activateur	Liaison directe	[181, 270]
<b>CITCO (Imidazothiazole)</b>	Homme	activateur	Liaison directe	[183]
<b>TCDD</b>	Souris	activateur	Agoniste du récepteur AhR	[239]
<b>PCB, DDT et ses dérivés, DDE</b>	Rat, Phoque de Baïkal, Souris	activateur		[271-277]
<b>DMP904</b>	Rat	activateur	Court-circuite le métabolisme thyroïdien	[278]
<b>DBP, phtalates, DEHP</b>	Rat en gestation, hépatocytes primaires humains	activateur	Effet anti-androgénique	[199, 279]
<b>Uranium</b>	Rat	activateur	Toxicité hépatique et extra-hépatique	[280]
<b>Trans-stilbène</b>	Souris, Rat	activateur		[281, 282]
<b>Nonyphénol</b>	Souris, hépatocytes primaires humains	activateur		[283]



<b>Pyrènes</b>	Souris	activateur	[284]
<b>Octachlorostyrène</b>	Souris	activateur	[285]
		Hypertrophie, porphyrie, altération de la synthèse de l'hème, induction des cytochromes	
<b>OPZ</b>	Souris	activateur	[286, 287]
<b>Acide perfluorocarboxylique</b>	Souris	activateur	[288]
		Agoniste PPAR $\alpha$	

*Abbreviations : TCPOBOP, 3,3',5,5'-Tétrachloro-1,4-bis(pyridyloxy)benzene ; CITCO, -(4-chlorophenyl)imidazo [2,1-b][1,3]-thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime ; PCB, polychlorinated biphenyls ; DDT, dl,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane ; DDE, 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene DMP904, 4-(3-pentylamino)-2,7-dimethyl-8-(2-methyl-4-methoxyphenyl)-pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidine DBP, di-n-butyl phthalate ; DEHP, Di-(2-ethylhexyl)-phthalate ; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin ; OPZ, olipraz.*

MOLECULES	MODELES	ACTION	MECANISME	REFERENCES
<b>MEDICAMENTS</b>				
<b>Phénobarbital</b>	Souris, Rat	activateur	Translocation de CAR	[142-144, 240]
<b>Phénytoïne</b>	Hépatocytes primaires humains et murins	activateur	Translocation de CAR	[157, 163, 289]
<b>Acide valproïque</b>	Lignée hépatique humaine HepG2	activateur	Co-activation de PXR	[171]
<b>Métamizole</b>	Analyse de gène rapporteur	activateur	Absence de liaison directe	[290]
<b>Acétaminophène</b>	Souris	activateur		[291]
<b>Benzodiazépines</b>	Transfection cellulaire avec la forme humaine de CAR	inhibiteur		[292]
<b>Antifongiques triazolés</b>	Souris	activateur		[293, 294]
<b>Clotrimoxazole</b>	Hépatocytes primaires humains	inhibiteur		[270]
<b>Kétoconazole/ Miconazole</b>	Lignée hépatique humaine HepG2, hépatocytes primaires humains	inhibiteur	Antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes, dissociation des co-activateurs	[295, 296]
<b>Déxaméthasone</b>	Hépatocytes primaires humains, souris CAR-déficientes	activateur	Agoniste du récepteur aux glucocorticoïdes	[226, 297]

<b>Artémisine</b>	Homme (hépatocytes primaires, lignées) Souris (hépatocytes primaires, cellules HEK293)	activateur	[165, 298]
<b>Statines</b>	Cellules endothéliales et musculaires lisses humaines transfectées	activateur	[299-301]
<b>Meclizine</b>	Souris et Homme	activateur (Souris) inhibiteur (Homme)	[302]
<b>Méthotrexate</b>	Analyse de gène rapporteur et souris	inhibiteur	Réprime l'expression de CAR [303, 304]
<b>Orphénadrine</b>	Rat	activateur	? [305]
<b>Ligands PPAR<math>\alpha</math></b>		inhibiteur	Agoniste inverse, interfère avec le recrutement des co-activateurs [252]
<b>Cocaïne</b>		inhibiteur	Diminue l'expression de GR, CAR et de leurs cibles [306]

<b>Méthadone</b>	Hépatocytes primaires humains et lignée immortalisée	activateur	[307]
<b>Bubrénorphine</b>	Lignée hépatique humaine HepG2	activateur	[308]
<b>Colchicine</b>	Lignée cellulaire humaine et hépatocytes primaires humains	inhibiteur	Court-circuite l'action du récepteur aux glucocorticoïdes [223, 224]
<b>Sulfamides et thiazolidine</b>	Hépatocytes primaires humains	activateur	[309]
<b>Clotrimazole</b>	Cellules transfectées avec la forme humaine de CAR	inhibiteur	Liaison au domaine de liaison du ligand [270]
<b>Ginkgo Biloba</b>	Hépatocytes humains primaires et lignée immortalisée	activateur	[310]
<b>Yin Zhi Huang</b>	Souris sauvages et transgéniques pour la forme humaine de CAR et hépatocytes	activateur	[311-313]
<b>Guggulstérone</b>	Transfection cellulaire	inhibiteur	[313, 314]
<b>Baicaline, baicaléine, acide cholorigénique, et ginsénoside Rf</b>		activateur	[315]

MOLECULES	MODELES	ACTION	MECANISMES	REFERENCES
<b>DERIVES ALIMENTAIRES</b>				
<b>Régime enrichi en graisse</b>	Rat	activateur	Stimule l'expression de CAR	[316]
<b>Ail</b>	Rat	activateur		[317]
<b>Acide docosahéxaénoïque</b>	Hépatocytes primaires de Rat	inhibiteur	Inhibe la translocation de CAR induite par le phénobarbital	[318]
<b>Acides gras polyinsaturés</b>	Souris	activateur		[319]
<b>Acide cis-9 rétinolique</b>		inhibiteur	Diminue la quantité de récepteur disponible pour l'hétérodimérisation	[320]
<b>Flavonoïdes</b>	Homme, Souris	activateur		[321]

L'élimination des composés toxiques met en jeu de nombreuses réactions de biotransformation (phase I et II) au niveau notamment du foie, mais aussi de l'intestin, du rein, du poumon et du placenta [322]. Ces réactions permettent d'accroître le caractère hydrophile des toxiques et ainsi facilitent leur excrétion. L'élimination des métabolites est alors assurée par le fonctionnement coordonné de nombreux transporteurs (phase III).

**Phase I :** regroupe les réactions d'oxydation (hydroxylation et désamination), de réduction et d'hydrolyse. Les principaux acteurs sont les cytochromes oxydases, notamment la sous-famille 3a qui est responsable de la transformation de plus de 50% des médicaments.

**Phase II :** regroupe les réactions de conjugaison. Les enzymes intervenant sont les sulfotransférases (Sult), les UDP-glucuronyltransférases (Ugt), les NADPH-quinone oxydoréductases, les NADPH-ménadione réductases, les époxydes hydrolases, les glutathion-S-transférases (Gst) et les N-acétyltransférases.

**Phase III :** regroupe les transporteurs hépatiques, biliaires et intestinaux jouant un rôle crucial dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des toxiques. Les principaux transporteurs mis en jeu sont les glycoprotéines P de la famille Mdr1 (Multi Drug Resistance 1), les protéines de la famille Mrp (Multidrug Resistance gene-associated Protein) ainsi que les transporteurs de type Oatp (Organic Anion-Transporting Polypeptide).

La génération de souris déficientes pour CAR par Wei et *al.* [260] a permis de confirmer le rôle prépondérant de ce récepteur dans la régulation des systèmes de détoxification. En effet, les souris déficientes sont incapables d'induire les cytochromes oxydases, notamment Cyp2b10, 1a1, 1a2 et 3a11 après traitement par TCPOBOP ou phénobarbital [260, 323, 324]. Alors que ces souris montrent une diminution du catabolisme de différents xénobiotiques comme la zoxazolamine et l'acétaminophène [291], les souris sauvages traitées au phénobarbital catabolisent plus vite les xénobiotiques comme la cocaïne et les anesthésiques [260].

**Tableau 4 : Cibles du récepteur nucléaire CAR impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.** CAR coordonne l'expression de nombreux gènes hépatiques impliqués dans le catabolisme des xénobiotiques : il induit les réactions de transformation via les cytochromes oxydases ou CYP (phase I), la conjugaison des métabolites par les glutathionine S-transférases (Gst), les sulfotransférases (Sult) et les UDP-glucuronosyltransférases (Ugt) (phase II) ainsi que l'élimination des toxiques de la circulation sanguine par les transporteurs de type Mdr (Multi Drug Resistance), Mrp (Multidrug Resistance gene-associated Protein), Oatp (Organic Anion-Transporting Polypeptide), Bcrp (Breast Cancer Resistance Protein) et Abcg5/g8 (ATP-binding cassette sub-family g5/8) (phase III) [325]. CAR lie des séquences de répétition directe (DR, Direct Repeat) ou inversée (IR, Inverted Repeat).

GENES	ORGANISMES	ELEMENT DE REPONSE	RECEPTEURS	MOLECULES DETOXIFIEES	REFERENCES
<b>HYDROXYLATION (PHASE I)</b>					
<b>Cyp1a1/2</b>	Souris Homme	IR8	CAR	Polluants (nitrosamines et polycycliques), pro-carcinogènes, œstrogènes, hème	[166, 323]
<b>Cyp2a4</b>	Souris		CAR	Ethanol et acétone	[323]
<b>Cyp2a6</b>	Homme				[326]
<b>Cyp2b1/2</b>	Rat	DR4	CAR, PXR	Testostérone, hydroxystéroïde produisant de l'androstène-dione	[240]
<b>Cyp2b6</b>	Homme	DR4	CAR, PXR		[240, 327]
<b>Cyp2b10</b>	Souris	DR4	CAR, PXR		[240]

<b>Cyp2c8</b>	Homme			Acide arachidonique et rétinolique	[174]
<b>Cyp2c9</b>	Homme	DR4	CAR, PXR	acide arachidonique, acide linoléique	[243, 328]
<b>Cyp2c19</b>	Homme	DR4	PXR, CAR		[329]
<b>Cyp3a1</b>	Rat		PXR, CAR		[161]
<b>Cyp3a4</b>	Homme	IR6, DR3, DR4	PXR, CAR		[240, 330],
<b>Cyp3a11</b>	Souris		PXR, CAR		[323]
<b>Cyp2c55</b>	Souris	DR4	PXR, CAR	Synthèse de l'acide 19 hydroxyeicosatétraenoïque	[331]
<b>Aldéhyde déshydrogénase</b>	Souris		PXR, CAR		[323]
<b>Estérase 1</b>	Souris		CAR		[324]
<b>Carboxylestérase 6</b>	Souris		PXR, CAR	Transformation des pro-drogues anticancéreuses	[332]
<b>Aldo-céto réductase 1b7</b>	Souris	DR4	PXR-CAR	Détoxification des acides gras peroxydés	[333]



GENES	ORGANISMES	ELEMENT DE REPONSE	RECEPTEURS	MOLECULES DETOXIFIEES	REFERENCES
<b>CONJUGAISON (PHASE II)</b>					
<b>Gsta1/2/3</b>	Souris	?	CAR PXR		[323, 334]
<b>Sult2a1</b>	Souris	IR0	CAR	Iodothyronine, œstrogènes, acide lithocholique, hydroxystéroïdes	[323, 335]
<b>Ugt1a1</b>	Homme	DR4	CAR PXR	Bilirubine et œstrogènes	[336]
<b>Ugt2b1</b>	Rat			Trans-stilbène	[281, 282]

GENES	ORGANISMES	ELEMENTS DE REPONSE	RECEPTEURS	MOLECULES DETOXIFIEES	REFERENCES
<b>TRANSPORTEURS (PHASE III)</b>					
<b>Mdr1a</b>	Souris		PXR, CAR		[323]
<b>Mrp1</b>	Souris		CAR		[323]
<b>Mrp2</b>	Souris	IR8	PXR, CAR	Dérivés glucuronidés (bilirubine, œstradiol), leucotriènes C4	[167]
<b>Mrp3</b>	Souris		PXR, CAR	Dérivés glucuronidés de la bilirubine	[323]
<b>Mrp4</b>	Souris				[335]
<b>Mrp5, 6, 7</b>	Souris				[337]
<b>Oatp2</b>	Souris Rat	DR3?	CAR PXR		[323, 338]
<b>Bcrp</b>					[339]
<b>Abcg5/g8</b>	Souris		CAR	Inhibition de la sécrétion du cholestérol biliaire et intestinal	[23, 340]

Cependant, l'activation de ces différentes voies métaboliques peut avoir des effets délétères. En effet, les réactions de transformation génèrent des intermédiaires métaboliques potentiellement plus toxiques. Par exemple, le catabolisme du paracétamol produit des dérivés toxiques dont les effets sont annihilés chez les souris déficientes pour CAR [291]. D'autre part, les inducteurs enzymatiques sont susceptibles d'influencer le métabolisme d'autres médicaments administrés conjointement. Ainsi, la phénytoïne (médicament antiépileptique) diminue les concentrations circulantes de clozapine (médicament antipsychotique) [341]. De façon analogue, les patients épileptiques traités par carbamazépine ont des taux plus importants de cytochromes oxydases 1a1, 1a2, 2b6 et 3a4 [342].

## **B. CAR et détoxification des composés endogènes**

Les cytochromes oxydases hydroxylent de la même façon des composés endogènes comme les stéroïdes, le cholestérol, les acides gras, les vitamines A et D et les acides biliaires [343]. Ainsi, les cibles induites par CAR en réponse aux xénobiotiques interviennent également dans le catabolisme et l'excrétion de ces composés endogènes. Le traitement par TCPOBOP induit de façon CAR-dépendante la transformation des hormones stéroïdes et thyroïdiennes, mais aussi la détoxification des acides biliaires et de la bilirubine.

### **1. CAR et métabolisme des hormones stéroïdiennes**

Les premiers modulateurs endogènes identifiés de CAR sont les dérivés de nature stéroïdienne : androstanol et androsténol [131]. L'androstanol diminue l'activité basale des formes humaine et murine de CAR, alors que le 5 $\beta$ -prégnane-3,20-dione active faiblement CAR chez l'Homme et n'a aucun effet chez la souris. De façon analogue, la progestérone et la testostérone répriment l'activité de CAR [208].

A l'inverse, l'œstradiol et l'œstrone, ainsi que le 3,20-prégnane-dione (métabolite de la progestérone) stimulent les formes humaine et murine de CAR [160, 238]. Ainsi, l'œstradiol induit la cytochrome oxydase 2b10 [344] de façon dépendante de CAR [238]. La déhydroépiandrostérone, stéroïde le plus abondant, précurseur des hormones sexuelles (androgènes et œstrogènes) induit la translocation de CAR mais ses effets persistent chez les souris déficientes pour CAR [345].

Réciproquement, CAR est susceptible de moduler le métabolisme de certaines hormones stéroïdiennes. La stimulation de CAR par le TCPOBOP induit le catabolisme des œstrogènes [346] par induction des cytochromes oxydases de la famille 2b et favorise leur excrétion par induction de la conjugaison [182, 336]. Bien que les stéroïdes exercent des effets contrastés, CAR peut vraisemblablement être considéré comme un régulateur de la balance des hormones sexuelles ce qui pourrait expliquer les différences de genre chez les souris traitées par TCPOBOP avec une réponse accrue chez les femelles [232, 240]. En revanche, les effets régulateurs des stéroïdes sur la forme murine de CAR ne sont pas retrouvés chez l'Homme ; ceci peut s'expliquer par les différences de séquences du domaine de liaison du ligand [182]. De plus la fertilité et le développement ne sont pas affectés chez les souris déficientes pour CAR ce qui laisse présumer que le récepteur n'a pas d'incidence perceptible sur l'homéostasie des stéroïdes en condition physiologique [347].

**Tableau 5 : Hormones sexuelles susceptibles d'influencer l'activité du récepteur nucléaire CAR.**

HORMONES	ESPECES	ACTIVITE	MECANISMES	REFERENCES
<b>Déhydroépiandrostérone et dérivés sulfatés</b>	Souris	stimulation		[345, 348]
<b>Androstanol (stéroïde)</b>	Homme Souris	stimulation inhibition		[131, 270, 349]
<b>5<math>\alpha</math>-androstén-3<math>\alpha</math>-ol et 5<math>\alpha</math>-androstán-17<math>\alpha</math>-ol (stéroïde)</b>	Homme Souris	inhibition		[320]
<b>5<math>\beta</math>-pregnan-3,20-dione (métabolite de la progestérone)</b>		stimulation	Liaison au domaine de liaison du ligand	[270]
<b>Œstrogènes/androgènes endogènes ou exogènes</b>	Homme Souris	stimulation inhibition	Liaison des co-régulateurs	[238, 350]

## 2. CAR et métabolisme des hormones thyroïdiennes

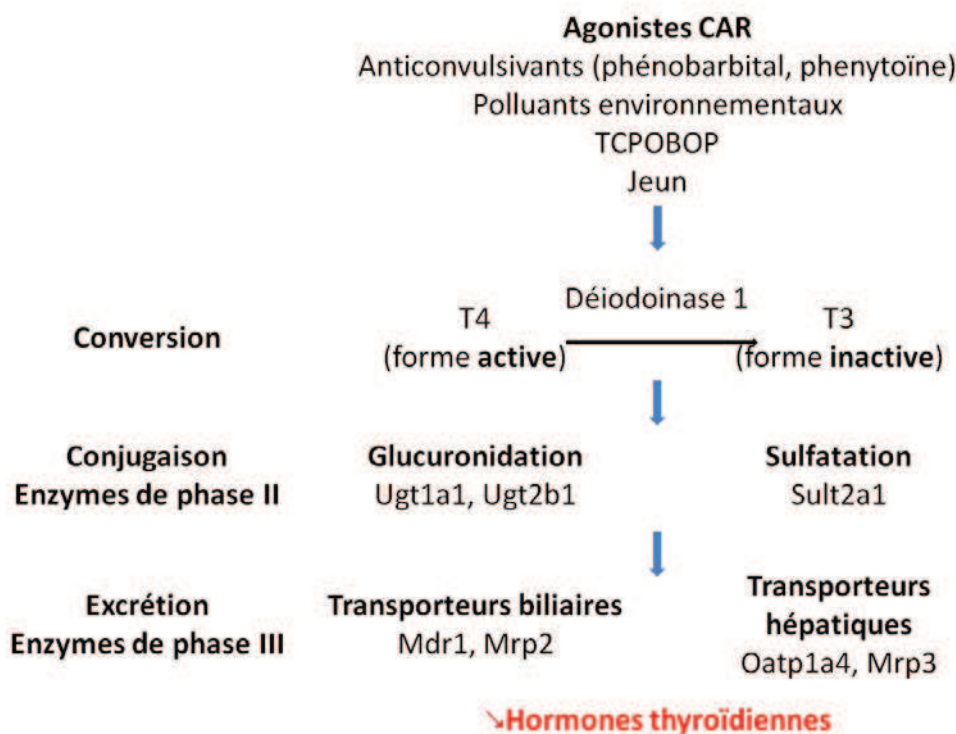
L'intervention de CAR dans le métabolisme thyroïdien a été mise en évidence par l'étude du statut hormonal de patients épileptiques ou d'animaux traités par phénobarbital [351-358]. Ainsi, les patients en hypothyroïdie ont besoin de doses plus importantes d'hormone de substitution s'ils suivent un traitement antiépileptique (phénobarbital, phénytoïne ou carbamazépine) ou antibiotique (rifampicine) ou en cas de déséquilibre hormonal (excès d'œstrogènes durant la grossesse) [359, 360]. Ainsi, la phénytoïne, utilisée comme anticonvulsivant active la cytochrome oxydase 2c29 chez l'Homme [157] et la cytochrome oxydase 2b6 chez la Souris [163] par l'intermédiaire de CAR et nécessite la mise en place d'un traitement hormonal de substitution.

Qatanani *et al.* [361] ont alors démontré que CAR est responsable des effets du phénobarbital sur le taux circulant d'hormones thyroïdiennes. En effet, l'induction spécifique de CAR par le TCPOBOP induit chez la Souris une augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes et une diminution du taux circulant de l'hormone T4 en stimulant de façon coordonnée leur conjugaison et sulfatation ainsi que leur élimination. CAR participe donc au métabolisme thyroïdien, en mettant en œuvre des voies métaboliques semblables à celles intervenant dans la détoxification des xénobiotiques.

Cette interrelation explique les dysfonctionnements thyroïdiens engendrés par l'accumulation des polluants environnementaux, qui en ciblant CAR induisent des perturbations de l'homéostasie thyroïdienne [362-364]. Ainsi Szabo *et al.* [365] ont montré que les retardateurs de flammes sont des agonistes de CAR qui induisent une diminution des hormones thyroïdiennes par augmentation de l'élimination biliaire des hormones sous forme conjuguée, non seulement par stimulation des enzymes de conjugaison mais aussi des transporteurs. De plus, les retardateurs sont lipophiles et présentent une certaine homologie structurale avec les hormones thyroïdiennes et sont ainsi capables de lier la protéine de transport des hormones thyroïdiennes.

Par ailleurs, Tien *et al.* [366] ont montré que CAR stimule la déiodinase 1, responsable de la transformation des hormones thyroïdiennes actives en une forme moins active, plus facilement éliminable et pouvant entrer en compétition avec la forme active au niveau des transporteurs et des récepteurs.

Le statut alimentaire, notamment le jeun, induit une augmentation des cibles de CAR corrélée à une diminution du taux circulant d'hormones thyroïdiennes [367]. Ces effets sont annihilés chez les souris déficientes pour CAR, qui ne présentent aucune modification de leur statut hormonal en condition de jeun ou après injection de TCPOBOP. En effet, le jeun stimule l'expression du co-activateur PGC-1 $\alpha$  [368], cofacteur transcriptionnel nécessaire à l'activation de CAR [369]. Par son rôle dans le métabolisme thyroïdien, CAR participerait également au maintien de l'homéostasie et du poids lors de restriction calorique. En effet, les souris déficientes pour CAR perdent plus de poids que les souris sauvages quand la ration alimentaire est réduite de 40% [367].



**Figure 14 : Rôle de CAR dans le métabolisme thyroïdien.** La stimulation de CAR provoque l'induction des enzymes responsables du catabolisme des hormones thyroïdiennes. 1) CAR stimule la conversion et l'inactivation de l'hormone thyroïdienne T4 ; 2) induit la conjugaison des hormones par les UDP-glucuronosyltransférases (Ugt1a1 et 2b1) et la sulfatation par la sulfotransférase Sult2a1 ; 3) favorise l'excrétion des hormones thyroïdiennes par les transporteurs biliaires Mdr2 (Multi Drug Resistance1) et Mrp2 (Multidrug Resistance gene-associated Protein2) et hépatiques Oatp1a4 (Organic Anion-Transporting Polypeptide 1a4) et Mrp3 (Multidrug Resistance gene-associated Protein) [361].

Réciproquement, Ooe et *al.* [370] ont montré qu'en l'absence de sérum, les cellules de type SH (Small Hepatocytes) n'expriment pas CAR et que l'addition d'hormones thyroïdiennes permet de restaurer l'expression du récepteur.

### 3. CAR et métabolisme de la bilirubine et de l'hème

La bilirubine, produit du catabolisme de l'hémoglobine est un intermédiaire métabolique extrêmement toxique. Son accumulation est associée à un ictère, une toxicité neurale pouvant induire une encéphalopathie chez le nouveau-né. L'élimination de la bilirubine est assurée par l'enzyme Ugt1a1 qui catalyse la conjugaison avec l'acide glucuronique qui est alors secrété dans la bile par le transporteur canaliculaire Mrp2.

Durant de nombreuses années, le phénobarbital a été utilisé dans le traitement de l'ictère néonatal [371, 372]. Cette propriété est en fait dépendante de CAR. De façon analogue à PXR, la stimulation du récepteur nucléaire CAR favorise l'excrétion de la bilirubine via la régulation coordonnée des enzymes de conjugaison Ugt1a1 et Gsta1 [336, 373] et des transporteurs Oatp2 et Mrp2 [338]. Réciproquement, les voies d'élimination de la bilirubine sont moins efficaces chez les souris déficientes pour CAR [373]. La bilirubine ne semble pas être un ligand direct de CAR mais induirait de façon similaire au phénobarbital la translocation nucléaire de CAR [373].

Un des facteurs intervenant dans la maturation hépatique l'oncostatine M (membre de la famille des interleukines 6) participerait également à la régulation de l'expression des UDP-glucuronosyltransférases par CAR. En effet, les prématurés atteints d'hyperbilirubinémie néonatale présentent des taux anormalement bas d'oncostatine M, corrélés à une baisse de l'expression de l'Ugt1a et une altération de l'élimination de bilirubine. Masuyama et *al.* [374] ont ainsi mis en évidence que l'oncostatine M stimule *in vivo* et *in vitro* le catabolisme de la bilirubine via CAR.

Bien que la synthèse de l'hème soit stimulée par le traitement au phénobarbital, cet effet semble en partie indépendant de CAR, puisque le phénobarbital induit l'expression de la 5-aminolevulinic acide synthase 1, enzyme clef de la biosynthèse de l'hème même chez les souris déficientes pour CAR [375].

## 4. Existence d'autres régulateurs endogènes de CAR

Les facteurs endogènes capables de moduler l'activité transcriptionnelle et l'expression de CAR décrits dans la littérature sont recensés ci-dessous.

**Tableau 6 : Régulateurs endogènes potentiels du récepteur nucléaire CAR.**

FACTEURS ENDOGNES	MODELES	ACTION	REFERENCES
<b>Médiateurs de l'inflammation (arthrite et réponse au lipopolysaccharide) :</b>			[374, 376-382]
<b>IL 6 et oncostatine M</b>	Hépatocytes primaires humains	stimulation	
<b>IL1-<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math></b>	Souris et hépatocytes primaires humains	inhibition	
<b>Hypoxie : HIF-1, AP1</b>	Lapin	stimulation	[383]
<b>Régénération hépatique : facteur de croissance hépatique</b>	Souris	inhibition	[211]
<b>Jeun : AMPc, HNF4<math>\alpha</math>, PGC1<math>\alpha</math></b>	Souris		[250, 384]

## C. CAR et prolifération hépatique

Les inducteurs enzymatiques ne lient pas et n'endommagent pas l'ADN, mais augmentent la prolifération cellulaire et diminuent l'apoptose [385]. L'augmentation de la ploïdie est alors associée à une augmentation de l'activité métabolique. Bien que l'augmentation de la masse hépatique soit transitoire (mécanisme adaptatif) pour permettre l'élimination des xénobiotiques, cela favorise la création d'environnement pro-tumoral.



Le TCPOBOP et le phénobarbital ont ainsi été décrits comme des hépatocarcinogènes non génotoxiques. En effet, le phénobarbital est connu pour induire des tumeurs chez la Souris et le Rat par hyperplasie hépatique [386]. Le TCPOBOP est un puissant agent mitogène notamment chez la Souris [387-390]. Il favorise le développement de tumeurs de la sphère oto-rhino-laryngée chez le Rat mais pas le développement de tumeurs hépatocellulaires [391]. Alors que le phénobarbital est rapidement éliminé du foie, le TCPOBOP persiste plus longtemps dans l'organisme [392], ainsi l'induction de la cytochrome oxydase 2b10 persiste au-delà de trois jours après l'arrêt du TCPOBOP.

Des études indépendantes ont montré le rôle central de CAR dans le processus cancéreux induit par le phénobarbital [393-396] et le TCPOBOP [397]. Les effets du TCPOBOP sur la prolifération hépatique sont dépendants de CAR, ainsi les souris déficientes pour le récepteur CAR ne développent pas de prolifération cellulaire en réponse au TCPOBOP [260]. CAR est donc requis pour le développement d'une hépatomégalie en réponse aux xénobiotiques. La stimulation de CAR induit une hyperplasie et une hypertrophie en stimulant l'expression du gène de prolifération cellulaire Mdm2 (Mouse Double Minute-2), associée à l'induction de la réplication de l'ADN et la suppression de l'apoptose [398, 399].

Il existe des différences inter-espèces : en effet, le traitement chronique par barbiturique induit une carcinogenèse chez les souris humanisées pour CAR, mais n'est pas associé à une augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques chez l'Homme [400]. De même, les modèles murins humanisés pour CAR présentent une hypertrophie hépatique sans hyperplasie [401]. De manière générale, l'Homme semblerait plus résistant que la Souris aux tumeurs (doses plus faibles, télomères plus courts) [402].

A l'inverse, de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ont été identifiés comme cibles de CAR, notamment ; McI1 (Myeloid Cell Leukemia sequence 1) : protéine anti-apoptotique impliquée dans la protection du foie lors de l'apoptose induite en réponse aux agressions hépatocellulaires par les acides biliaires [403]. CAR agit au niveau de nombreuses protéines régulant le cycle cellulaire notamment la cycline D1, FoxO1 (Forkhead bOX M1) et stimule l'expression de Gadd45 (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible), protéines impliquées dans la prévention de l'apoptose [389, 397, 404]. Ainsi, *in vivo*, le traitement par TCPOBOP n'altère pas le bilan hépatique et ne semble donc pas exercer d'effet toxique sur le foie [230].

## D. CAR et métabolisme des acides biliaires

Les acides biliaires participent à la création d'un gradient et stimulent le flux biliaire et par conséquent l'élimination des toxiques. Grâce à son rôle dans la régulation des systèmes de détoxification, CAR participe également à l'homéostasie des acides biliaires.

Au même titre que pour certains xénobiotiques, la toxicité des acides biliaires est accrue chez les souris CAR déficientes [162, 260, 405]. En conditions pathologiques (ligature biliaire et cholestase), les souris déficientes pour CAR et/ou PXR développent plus de nécrose au niveau hépatique. Ce phénomène est associé à la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et le remodelage [406, 407]. Ces observations démontrent donc un rôle important de CAR dans la détoxification des acides biliaires chez la souris.

L'acide biliaire le plus hydrophobe et le plus toxique est l'acide lithocholique, responsable des dommages hépatiques lors des cholestases. Cet effet est contrecarré par l'action coordonnée de cytochromes oxydases (phase I) et d'enzymes de conjugaison (phase II) qui vont hydroxyler l'acide lithocholique et l'éliminer. Dans le cas d'un régime enrichi en acides biliaires, l'activation de CAR par son ligand spécifique TCPOBOP [181] ou la surexpression constitutive de CAR sont capables de réduire les niveaux plasmatiques d'acides biliaires et de prévenir l'hépatotoxicité des acides lithocholique et cholique [162, 335, 347, 381, 405, 407-411]. Les effets protecteurs de CAR sont liés à la régulation coordonnée du système de détoxification hépatique impliquant les enzymes de phase I, II et III, ce qui permet de limiter les dommages tissulaires hépatiques [407] et diminuer les niveaux d'acides biliaires circulants.

*Nota bene : bien que l'acide lithocholique active l'expression de CAR notamment chez les souris déficientes pour FXR ou PXR, aucune liaison directe n'a été mise en évidence.*

**Tableau 7 : Régulation coordonnée du métabolisme biliaire par CAR.** Le récepteur nucléaire CAR stimule l'expression des cytochromes oxydases ou CYP (enzymes de phase I) intervenant dans la formation des acides biliaires, leur conjugaison par les glutathionine S-transférases (Gst), les sulfo transférases (Sult) et les UDP-glucuronosyltransférases (Ugt) (enzymes de phase II) ainsi que leur élimination par les transporteurs de Mrp (Multidrug Resistance gene-associated Protein), Oatp (Organic Anion-Transporting Polypeptide), Bsep (Bile Salt Export Pump), Ost (Organic Solute Transporters  $\alpha/\beta$ ), et diminue l'expression du transporteur Ntcp ( $Na^+$ -dependent Taurocholic Cotransporting Polypeptide) impliqué dans l'influx basolatéral des acides biliaires (enzymes de phase III).

ETAPES	EFFETS DE CAR	GENES CIBLES	REFERENCES
<b>ENZYMES DE PHASE I</b>			
Synthèse	Induction	Cyp7a1	[412]
Transformation	Induction de l'hydroxylation	Cyp8b1	[412]
Synthèse alternative	Induction de la production d'acide chénodésoxycholique	Cyp7b1, 27a1, 39a1	[412]
Transformation	Prévention de la formation d'acide lithocholique	Cyp3a11 et 2b10	[405, 408, 412, 413]
<b>ENZYMES DE PHASE II</b>			
Conjugaison	Induction	Sult2a1, Ugt1a, Gst	[335, 414]

### ENZYMES DE PHASE III

Import	Diminution	Ntcp	[409, 410]
Import	Induction et limitation des niveaux plasmatiques d'acides biliaires	Oatp2	[338, 373, 405, 409]
Excrétion biliaire	Induction	Mrp2, Bsep (Homme)	[409]
Export alternatif, cholestase	Induction	Mrp3, Mrp4, Ost $\alpha$ / $\beta$	[335, 347, 405, 409]
Excrétion urinaire, cholestase	Induction	Mrp2 et 4	[335]

Les différentes études mentionnées dans le tableau ci-dessus montrent que CAR induit la transformation et l'élimination des acides biliaires aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. Ainsi, le TCPOBOP et le phénobarbital sont capables de stimuler le niveau d'expression basal des systèmes de détoxification et d'induire la diminution de la bilirubine et des acides biliaires du sérum [409].

Bien que le métabolisme biliaire soit régulé par l'action coordonnée des récepteurs FXR et PXR, CAR est capable d'exercer ses effets protecteurs indépendamment des autres récepteurs nucléaires [347]. Il semble même que CAR constitue en quelque sorte une troisième ligne de défense contre la toxicité des acides biliaires. En effet, le niveau d'expression de CAR et de ses gènes cibles est augmenté chez les souris déficientes pour FXR et PXR sous régime enrichi en acide cholique. Les effets protecteurs de CAR sont majorés par le prétraitement au TCPOBOP ou phénobarbital et suffisant pour protéger le foie de la toxicité des acides biliaires [410]. Certains des effets de CAR semblent néanmoins dépendants d'autres récepteurs nucléaires. Ainsi, le TCPOBOP induit l'expression du récepteur PXR, élément majeur du catabolisme des acides biliaires [415].

Il apparaît toutefois que le rôle régulateur de CAR s'exerce différemment selon les conditions physiopathologiques ; dans le cas de la ligature biliaire, les souris déficientes pour CAR présentent plus de lésions hépatiques que les souris sauvages. Les mécanismes de protection s'apparentent à ceux observés lors des régimes riches en acides biliaires (diminution de l'import hépatique, stimulation de la conjugaison), mais paradoxalement la concentration plasmatique totale en acides biliaires est réduite chez les souris déficientes [406]. De plus, la composition du pool d'acides biliaires est différente ; les souris sauvages, plus résistantes, présentent des taux plus importants d'acides biliaires hydrosolubles, ainsi qu'une concentration en acides biliaires hépatiques et vésiculaires plus élevée, ceci serait le résultat non pas d'une synthèse accrue en acides biliaires, mais plutôt d'une meilleure efficacité de transformation des acides biliaires par la voie alternative (voie des oxystérols). A l'opposé, chez les souris déficientes, la voie classique semble privilégiée avec une perte de la répression de Cyp7b1.

Wagner et *al.* [409] rapportent que la stimulation de CAR dans ces mêmes conditions, modifie le niveau d'hydroxylation, diminue les acides biliaires plasmatiques et augmente leur excrétion urinaire.

## **E. CAR et métabolisme des lipides**

### **1. Effet du phénobarbital sur le bilan lipidique et le risque cardio-vasculaire**

De nombreuses études, parfois anciennes, réalisées à la fois à partir de données épidémiologiques chez des patients épileptiques traités par phénobarbital et chez les animaux rapportent des résultats contradictoires sur le bilan lipidique et la susceptibilité à l'athérosclérose.

#### *a. Données épidémiologiques*

Différentes études rapportent une augmentation du cholestérol plasmatique chez des patients traités de manière chronique [355, 416-419]. Le traitement par phénobarbital est alors associé à des modifications du profil lipoprotéique ; certaines études montrent une diminution de l'athérogénicité [420], avec augmentation du cholestérol HDL (High Density Lipoprotein) [418, 421, 422] ainsi qu'une diminution du taux de triglycérides [423]. A l'inverse, certains auteurs rapportent une augmentation du cholestérol LDL (Low Density Lipoprotein) [424] et des triglycérides. Un des mécanismes alors avancé mettrait en jeu l'utilisation compétitive des cytochromes oxydases et une réduction de la transformation du cholestérol en acides biliaires.

Globalement, l'ensemble des études offre des résultats contradictoires à propos du réel effet des différentes classes d'anticonvulsivants. Ces différences sont vraisemblablement en partie attribuables au manque de sélectivité du phénobarbital (double agoniste CAR et PXR chez l'Homme et activateur de PPAR $\alpha$  chez les souris déficientes pour CAR et PXR) [425, 426], à ses effets pléiotropes sur diverses voies métaboliques ainsi qu'à son utilisation en association avec d'autres anticonvulsivants comme la phénytoïne (double agoniste CAR/PXR) [427].

Par ailleurs, un des effets métaboliques majeurs du phénobarbital concerne l'homéostasie du glucose ; ainsi, le traitement à long terme diminue la glycémie chez les diabétiques de type II [428, 429]. Cet effet serait au moins en partie dépendant de CAR [168, 324, 387, 430, 431].

### ***b. Effets du phénobarbital chez l'Animal***

Des effets du phénobarbital comparables à l'Homme sont retrouvés chez les rongeurs [432]. L'analyse transcriptomique d'extraits de foie provenant de rats traités au phénobarbital montre une stimulation des gènes impliqués 1) dans la synthèse du cholestérol, associée à une augmentation du cholestérol plasmatique, 2) dans la lipolyse notamment avec la stimulation de la lipoprotéine lipase, associée à une diminution du taux d'acides gras libres et de triglycérides circulants [433].

Chez l'Homme [428], le traitement par phénobarbital diminue la glycémie des patients diabétiques et réprime l'expression des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse chez le Rat [387, 429]. Néanmoins, le phénobarbital n'est pas un agoniste sélectif de CAR et il est hautement probable qu'une grande partie des effets du phénobarbital soit indépendante de la présence de CAR ; ainsi le traitement par phénobarbital de souris CAR-déficientes induit une augmentation de la synthèse du cholestérol par stimulation de la squalène époxydase [434]. Cette induction est plus importante chez les déficientes pour CAR que chez les souris sauvages, laissant supposer que CAR pourrait limiter la synthèse de cholestérol au niveau basal et en présence d'agonistes spécifiques [434].

## **2. CAR et métabolisme des triglycérides et stéatose hépatique**

Récemment, l'impact de CAR sur le métabolisme de triglycérides a fait l'objet de plusieurs études indépendantes [23, 230, 340, 384, 435-437]. Cependant, les résultats obtenus sont contradictoires.

D'une part, il a été démontré que l'activation pharmacologique de CAR diminuait la triglycéridémie et la stéatose hépatique par inhibition de la lipogenèse hépatique [230, 435-437]. Le traitement de souris sauvages par le TCPOBOP a permis de mettre en évidence que CAR est capable de stimuler l'expression du facteur Insig-1 [388, 437, 438]. L'induction d'Insig-1 est alors associée à une diminution du clivage de la protéine Srebp1c et s'oppose ainsi au rôle transactivateur de Srebp1c sur l'expression de ses gènes cibles notamment Fas (Fatty Acid Synthase), Scd1 (Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1) et Acc (Acetyl-Coenzyme A Carboxylase) impliqués dans la lipogenèse *de novo*.

Le traitement de souris diabétiques obèses par TCPOBOP confirme l'effet de CAR sur la lipogenèse. Gao et *al.*[230] observent une diminution de l'expression hépatique de *Scd1*, *Acc*, *Fas*, et *Srebp1c* qui se traduit au niveau plasmatique par une diminution de la triglycéridémie. Il est par ailleurs important de souligner que l'expression des gènes intervenant dans l'absorption intestinale n'est pas altérée par le traitement et n'engendre pas de modification de l'excrétion des triglycérides dans les fécès.

A l'inverse, d'autres études démontrent que CAR joue un rôle négatif sur le métabolisme des triglycérides. Maglich et *al.* [367, 384] rapportent que la déficience de CAR protège contre l'hypertriglycéridémie observée chez les souris diabétiques déficientes pour le gène de la leptine ou provoquée par régimes gras. Inversement, le traitement par TCPOBOP de souris de type sauvage placées sous régime gras induit une augmentation des triglycérides plasmatiques. Rezen et *al.* [23] observent également une telle augmentation chez les souris sauvages sous régime standard avec d'une part une induction de la lipogenèse et de la cétogenèse, et d'autre part une répression de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale ainsi qu'une stimulation de l'expression de la pyruvate déshydrogénase bêta impliquée dans la formation de l'acéyl-Coenzyme A, substrat servant à la formation du cholestérol et des triglycérides.

### **3. Interférences entre CAR et les voies métaboliques dépendantes de PPAR $\alpha$**

Les différences observées quant au rôle de CAR dans le métabolisme des triglycérides pourraient en partie s'expliquer par la relation existant entre CAR et le récepteur PPAR $\alpha$ , acteur majeur du métabolisme des acides gras et des triglycérides au niveau hépatique [20, 439, 440]. En effet, CAR et PPAR $\alpha$  régulent un certain nombre de gènes communs mais exercent des effets souvent opposés sur les mêmes voies métaboliques, notamment l'oxydation des acides gras.

*In vivo*, l'activation pharmacologique de CAR chez des souris de type sauvage placées sous régime enrichi en graisses, diminue l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles *Cyp4a14*, *Cpt1a* (Carnitine Palmytoyl Transferase1a) et *Cte* (Cytosolic Acyl-Coenzyme A Thioesterase) [384]. Ainsi, le traitement par TCPOBOP induit une diminution globale de l'oxydation des acides gras chez les souris sauvages et participerait à l'augmentation de la triglycéridémie [384].



Inversement, la déficience pour CAR est associée à une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses cibles et se traduit par une augmentation du niveau de  $\beta$ -oxydation. Par conséquent, la déficience de CAR chez les souris diabétiques restaure les niveaux de triglycérides plasmatiques à un niveau normal [384].

Enfin, CAR intervient dans l' $\omega$ -oxydation microsomale en s'opposant à l'activation des cytochromes oxydases 4a14 et 4a10 [182, 367, 436], deux enzymes clefs responsables de stress oxydatif qui sont elles-mêmes connues pour être des cibles de PPAR $\alpha$ .

Les mécanismes d'interaction entre CAR et PPAR $\alpha$  sont les suivants :

- **Compétition pour la fixation sur le promoteur des gènes cibles.** Par exemple CAR est capable de lier l'élément de réponse à PPAR (PPRE, PPAR Response Element) de certains gènes cibles de PPAR $\alpha$ . CAR diminue ainsi la transactivation de l'acyl-Coenzyme A oxydase (première enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation) et à l'inverse stimule l'énoyl-Coenzyme A hydratase/3-hydroxyacyl-Coenzyme [175].
- **Inhibition indirecte des voies d'activation de PPAR $\alpha$  par CAR.** La stimulation de CAR par le TCPOBOP diminue l'expression de l'élongase 5 (Elov5) et de la Lipin1 et inhiberait ainsi indirectement des voies dépendantes de PPAR $\alpha$  [384]; en effet la Lipin1 active les voies cibles de PPAR $\alpha$ /PGC1 $\alpha$  notamment la  $\beta$ -oxydation et la phosphorylation oxydative mitochondriale [441] et contrôle l'expression de PPAR $\alpha$ . De son côté, Elov5 catalyse la synthèse d'acides gras à très longue chaîne [442], ligands de PPAR $\alpha$  [384].

Les effets de CAR sur les voies PPAR $\alpha$  semblent dépendre de la durée de traitement par TCPOBOP ; ainsi, l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles est abolie après huit semaines de traitement alors qu'un traitement unique diminue certes l'expression de PPAR $\alpha$  mais pas celle de ses gènes cibles [435]. De façon réciproque, CAR est régulé par PPAR $\alpha$ . Mais les études rapportent des résultats contradictoires quant au pouvoir activateur ou répresseur de PPAR $\alpha$  sur CAR.

Tout d'abord, l'expression de CAR est augmentée chez les souris déficientes pour PPAR $\alpha$  et n'est pas stimulée en réponse au fénofibrate [443]. Les acides gras libérés au cours du jeun ainsi que les agonistes PPAR $\alpha$  induisent non seulement PPAR $\alpha$  mais aussi CAR via un élément de réponse à PPAR $\alpha$  sur le promoteur de CAR [254, 367]. Les agonistes PPAR $\alpha$  induisent donc l'expression de CAR de façon PPAR $\alpha$ -dépendante [255] et potentialisent les effets du phénobarbital sur l'induction des gènes cibles de CAR [254].

Par ailleurs, Guo et *al.* [252] ont montré que les agonistes PPAR $\alpha$  induisent la translocation nucléaire de CAR indépendamment de la présence de PPAR $\alpha$ . A l'inverse de la translocation induite par le phénobarbital ou le TCPOBOP, la translocation induite par les agonistes PPAR $\alpha$  ne s'accompagne pas d'une stimulation de l'activité de CAR, mais plutôt d'une répression de son activité par liaison directe et fonctionnerait ainsi comme un agoniste inverse. En accord avec ce rôle répresseur, Columbano et *al.* [444] ont observé que la réponse de CAR au TCPOBOP est amplifiée chez les souris déficientes pour PPAR $\alpha$ .

#### **4. CAR et métabolisme du cholestérol**

L'activation de CAR module le profil lipoprotéique au moins chez la souris. Ainsi, Stedman et *al.* [406] ont montré que les souris déficientes pour CAR présentent une augmentation du taux de cholestérol HDL en condition de cholestase, suggérant un rôle négatif de CAR sur le métabolisme des HDL dans ces conditions.

De manière concordante, des études conduites dans notre laboratoire [22] ont démontré que la stimulation de CAR par son agoniste spécifique (TCPOBOP) provoquait chez des souris sauvages une diminution de 50% du cholestérol notamment au niveau de la fraction HDL (fraction principale véhiculant le cholestérol chez les souris sauvages) et dans une moindre mesure de la fraction LDL, sans affecter la triglycéridémie. Les souris surexprimant le gène humain de l'apolipoprotéine AI, constituant majeur des HDL, traitées par TCPOBOP présentent une majoration du phénotype avec une diminution de 60% du cholestérol HDL. La diminution du cholestérol HDL est alors associée à la diminution du niveau plasmatique de l'apolipoprotéine AI. Il semblerait que ces effets soit au moins en partie dus à une répression de la transcription du gène de l'apolipoprotéine AI au niveau hépatique par CAR par compétition avec HNF4.

Enfin, une étude récente a montré que le traitement par TCPOBOP induit une diminution du taux de cholestérol plasmatique chez les souris de type sauvage sous régime standard mais aussi en condition de surcharge en cholestérol [23]. En plus de l'effet mentionné précédemment sur le cholestérol HDL, l'activation de CAR diminue dans ces conditions, le cholestérol circulant associé aux LDL en stimulant leur capture hépatique via l'induction du récepteur aux LDL et s'oppose à l'accumulation hépatique du cholestérol en stimulant l'expression des enzymes de synthèse des acides biliaires et les systèmes d'élimination de ces molécules. Ces données sont similaires à celles obtenues dans notre laboratoire et présentée lors du chapitre précédent.

Une analyse transcriptomique complète du foie de ces souris montrait que parallèlement, l'acétyl-Coenzyme A acétyltransférase 2, enzyme clef de l'estérification du cholestérol destiné aux VLDL était réprimée. Certains gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol étaient induits, notamment ceux codant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase, la squalène époxidase, la lanostérol synthase et la stérol-C5-désaturase, mais cet effet n'était pas associé à une augmentation du ratio lanostérol/cholestérol indiquant que l'activation de CAR n'augmentait pas la biosynthèse du cholestérol.

De leur côté, Roth et *al.* [437] ont observé que l'activation de CAR entraînait une diminution du contenu hépatique en cholestérol associée à la répression de l'expression de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase. Deux types de mécanismes sont alors proposés par les auteurs pour expliquer l'inhibition de cette enzyme : 1) induction de la dégradation par les intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol (lanostérol et ses dérivés oxydés, les oxystérols), 2) répression de la transcription par le cholestérol provenant de la capture des LDL ou nouvellement synthétisé via Insig1 qui s'oppose à l'activité transactivatrice de Srebp1c.

L'ensemble de ces observations ne reflètent cependant pas les conditions dans lesquelles ont été observées les variations du bilan lipidique rapportées dans le cadre d'un traitement médicamenteux par phénobarbital chez l'Homme. L'objectif des travaux rapportés dans ce manuscrit est de déterminer les effets d'une stimulation chronique et spécifique de CAR sur le métabolisme des lipides et la susceptibilité à l'athérosclérose chez des souris présentant un profil lipoprotéique proche de l'Homme dans le cadre d'une surcharge alimentaire en cholestérol.

# **ETUDE EXPERIMENTALE**

CAR contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'hydroxylation, la conjugaison et l'excrétion de molécules exogènes potentiellement toxiques [260, 323, 445]. Il intervient également dans le métabolisme des composés endogènes comme les acides biliaires, la bilirubine, les triglycérides et les hormones thyroïdiennes [367, 373, 446, 447]. Une des fonctions reconnues de CAR est sa capacité à promouvoir la détoxification des acides biliaires en conditions de cholestase (ligature des voies biliaires ou surcharge alimentaire en acide biliaires hydrophobes) [347, 406, 409, 410, 412]. Son activation pharmacologique induit la transformation des acides biliaires en composés hydrophiles moins hépatotoxiques et leur élimination via les mécanismes précédemment évoqués [335, 408, 409]. A l'inverse, la déficience de CAR induit une exacerbation des dommages hépatiques [406, 412, 448]. A la différence d'autres récepteurs nucléaires, cet effet protecteur n'est apparemment pas en rapport avec une inhibition de synthèse des acides biliaires [412].

## **I. Objectifs de l'étude**

Le but de notre travail était donc de déterminer si CAR pouvait moduler l'élimination du cholestérol soit directement soit sous forme d'acides biliaires non plus en situation de cholestase mais chez des souris soumises à une surcharge alimentaire en cholestérol. En effet, le cholestérol est le premier précurseur des acides biliaires et sa sécrétion biliaire soit sous forme de cholestérol, soit sous forme d'acides biliaires est la principale voie d'élimination du cholestérol excédentaire du corps. Pour cela, des souris de type sauvage et déficientes pour le gène de CAR ainsi que deux modèles de souris dyslipidémiques ont été placées sous régime enrichi à 0,15% de cholestérol et traitées de façon hebdomadaire par 3,3',5,5'-Tétrachloro-1,4-bis(pyridyloxy)benzene (TCPOBOP), agoniste sélectif du récepteur CAR. Nous avons évalué l'efficacité des voies d'élimination du cholestérol et des acides biliaires chez ces souris. L'expression des principaux gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol aux niveaux hépatique et iléal a été mesurée par PCR en temps réel et par western blot. L'élimination fécale des stérols neutres et des acides biliaires a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Enfin la cinétique d'élimination du cholestérol endogène a été mesurée après injection de lipoprotéines de haute densité marquées avec du cholestérol radioactif.

## II. Article 1

### Accepted Manuscript

Constitutive androstane receptor activation stimulates fecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice

Anne Laure Sberna, Mahfoud Assem, Thomas Gautier, Jacques Grober, Boris Guiu, Aline Jeannin, Jean-Paul Pais de Barros, Anne Athias, Laurent Lagrost, David Masson

PII: S0168-8278(10)01090-1  
DOI: [10.1016/j.jhep.2010.10.029](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.029)  
Reference: JHEPAT 3615

To appear in: Journal of Hepatology

Received Date: 28 June 2010  
Revised Date: 29 September 2010  
Accepted Date: 18 October 2010



Please cite this article as: Sberna, A.L., Assem, M., Gautier, T., Grober, J., Guiu, B., Jeannin, A., de Barros, P.P., Athias, A., Lagrost, L., Masson, D., Constitutive androstane receptor activation stimulates fecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice, Journal of Hepatology (2010), doi: [10.1016/j.jhep.2010.10.029](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.029)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Constitutive androstane receptor activation stimulates fecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice**

Anne Laure Sberna<sup>1</sup>, Mahfoud Assem<sup>2</sup>, Thomas Gautier<sup>1</sup>, Jacques Grober<sup>1</sup>, Boris Guiu<sup>1,3</sup>, Aline Jeannin<sup>1</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>1</sup>, Anne Athias<sup>1</sup>, Laurent Lagrost<sup>1,3</sup>, David Masson<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR866, Faculté de Médecine; Institut Fédératif de Recherche Santé-STIC ; Université de Bourgogne-BP87900, 21079 Dijon Cedex, France, <sup>2</sup> Pharmaceuticals and Translational Therapeutics, College of Pharmacy, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, USA, <sup>3</sup> Centre Hospitalier Universitaire-Hopital du Bocage- Dijon, France.

**Correspondence:** David MASSON or Laurent LAGROST, Faculté de Médecine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon Cedex France. Tel: 33 3 80 39 32 63; Fax 33 3 80 39 34 47; email: [david.masson@chu-dijon.fr](mailto:david.masson@chu-dijon.fr) or [laurent.lagrost@u-bourgogne.fr](mailto:laurent.lagrost@u-bourgogne.fr)

**Abbreviations:** CAR: constitutive androstane receptor, TCPOBOP: 3,3',5,5'-Tetrachloro-1,4-bis(pyridyloxy)benzene, HDL: high density lipoproteins, CE: cholesteryl esters, LXR: liver X receptor.

**Word count:** 5472

**Number of figures:** 7

**Financial disclosures :** The authors have no conflict of interest to disclose

**Abstract**

**Background and aims:** The constitutive androstane receptor (CAR) is a nuclear receptor expressed in the liver and involved in xenobiotic metabolism. The aim of this study was to assess whether pharmacological CAR activation could affect neutral sterol and bile acid elimination under conditions of cholesterol overload.

**Methods:** Wild type, Car<sup>-/-</sup>, ApoE<sup>-/-</sup> and low-density lipoprotein receptor (Ldlr) <sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet were treated with the CAR agonist TCPOBOP.

**Results:** CAR activation was associated with a decrease in fecal cholesterol output related to the repression of the Abcg5/g8 cholesterol transporters. In contrast, TCPOBOP treatment induced a marked increase (up to three fold, P<0.01) in the elimination of fecal bile acids. It was related in the liver to the coordinated induction of genes involved in synthesis, sulfo-conjugation and excretion of bile acids as well as the repression of the ileal apical sodium-dependent bile acid transporter. Importantly, cholesterol accumulation was reduced in the liver of TCPOBOP-treated animals. In all cases, TCPOBOP had no effect in Car<sup>-/-</sup> mice. To determine directly whether CAR activation could affect the elimination of endogenous cholesterol, kinetic studies were performed with high-density lipoproteins (HDL) labelled with <sup>3</sup>H-cholesteryl esters. We observed that TCPOBOP-treated mice excreted more HDL cholesterol-derived bile acids in their feces. Finally, long-term CAR activation was associated with decreases in cholesterol content of the whole body and atherosclerosis susceptibility.

**Conclusions:** CAR is involved in the control of cholesterol and bile acid homeostasis, increasing reverse cholesterol transport under hyperlipidemic conditions.

**Word count of the abstract :** 242

**Keywords:** Constitutive androstane receptor, TCPOBOP; Bile acids; High density lipoproteins, cholesterol.



### Introduction

The nuclear receptor Constitutive Androstane Receptor (CAR, NR1I3) is a xenobiotic sensor that controls the expression of genes involved in the hydroxylation, conjugation and finally excretion of potentially harmful exogenous molecules [1-3]. In addition to these well-recognized functions, CAR plays a role in the metabolism of endogenous compounds such as bile acids, bilirubin, triglycerides and thyroid hormones [2, 4]. With regard to sterol metabolism, several independent studies have demonstrated that CAR is able to modulate plasma lipoprotein levels [5, 6] and one of the well recognized function of CAR is its ability to promote bile acid detoxification during cholestasis [7-11]. Unlike other nuclear receptors such as the Farnesoid X Receptor (FXR) or the Pregnane X Receptor (PXR), CAR does not seem to be directly activated by bile acids [1, 8, 11]. Nevertheless, it plays an important role by inducing the production of more hydrophilic and less hepatotoxic bile acids [7], both through stimulation of their conjugation [12] and activation of their excretion from hepatocytes through alternative export pathways [10, 13]. The importance of CAR has been demonstrated *in vivo* in murine models of cholestasis (bile duct ligation) or in mice fed with bile acid-enriched diets [7, 8, 10, 11]. In these models, pharmacological CAR activation reduced bile acid toxicity [7, 8, 11] while, in contrast, CAR deficiency resulted in an exacerbation of liver damage [7, 9, 12]. Interestingly, CAR seems to exert its protective effects during cholestasis by stimulating bile acid elimination rather than turning off their synthesis [7]. Therefore, we wanted to investigate whether CAR activation could also modulate the elimination of cholesterol, *i.e.* the primary bile acid precursor, in mice fed a cholesterol-enriched diet. Indeed, biliary secretion of cholesterol and bile acids is a major pathway to remove excess cholesterol from the body. To address this question, WT mice, Car-/- mice and two hypercholesterolemic mouse models (ApoE-/- and Ldlr-/- mice) were fed a western-type diet containing 0.15% cholesterol and treated weekly with the CAR specific

agonist 3,3',5,5'-Tetrachloro-1,4-bis(pyridyloxy)benzene (TCPOBOP) [14]. At the end of the treatment, the effect of CAR activation on sterol output as well as on expression of the main genes involved in bile acid and sterol metabolism was evaluated. We found that CAR activation resulted in a marked increase in fecal bile acid loss that was associated with a reduction in neutral sterol output. By using plasma lipoproteins labelled with  $^3\text{H}$ -cholesteryl esters, we observed that CAR activation was able to stimulate the elimination of cholesterol derived from HDL via its conversion into bile acids, *i.e.* the final step of the reverse cholesterol transport pathway. Altogether these data suggest that CAR activation is able to improve cholesterol homeostasis during diet-induced hypercholesterolemia.

### Materials and methods

A complete and detailed Material and Methods section is available online in the supporting information.

**Animals:** WT, Car<sup>-/-</sup> [3], Ldlr<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice on a homogenous C57Bl6 background (Jackson laboratory, Bar Harbor, Maine) were used in the present study. TCPOBOP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was given at a dose of 3 mg/kg to the mice by a weekly intraperitoneal injection. The animals were fed a western-type diet (21% fat and 0.2% cholesterol, Safe, Augy, France or Diet 88137 (Harlan Tekland, Madison, WI). All experimental procedures were in accordance with the local guidelines for animal experimentation. **Reverse cholesterol transport:** Mice were injected in the tail vein with high-density lipoproteins (HDL) labelled with <sup>3</sup>H-cholesteryl esters. Blood samples, livers and feces were collected up to 48 h after injection. Aliquots of the samples were used for total radioactivity determination or for selective extraction of neutral sterols and bile acids before scintillation counting. **Whole body cholesterol content determination:** Cholesterol content was determined by an enzymatic method after digestion of the mouse bodies including the washed gastrointestinal tract in ethanol/KOH. **Atherosclerosis lesions:** % of the total surface area covered by atherosclerosis lesions was determined by en face analysis of aorta after staining with oil red O. **Real time PCR:** Relative mRNA levels were determined by real time PCR using a Light-Cycler 2.0 (Roche, Meylan, France). **Western blot analysis:** Total protein extracts in RIPA buffer (50 µg) were used for western blot analysis. **Sterol and bile acid concentration:** Levels of neutral sterols and bile acids in the liver and the feces were determined by capillary gas chromatography/mass spectrometry.

**Results:**

**TCPOBOP treatment reduces the fecal loss of cholesterol and increases bile acid output in WT but not Car<sup>-/-</sup> mice.** WT and Car<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet were treated weekly with the CAR agonist TCPOBOP at 3mg/kg. After two weeks of treatment, the feces of individual animals were collected over a 24-hour period and their neutral sterol and bile acid contents were determined. In WT mice, TCPOBOP treatment induced a decrease of the fecal cholesterol excretion but dramatically increased the fecal bile acid output with all the major bile species significantly higher in TCPOBOP-treated mice than in untreated mice (fig. 1A). Interestingly, cholesterol concentration was significantly reduced in the livers of WT mice treated with TCPOBOP (fig. 1C). It indicates that the decrease of fecal cholesterol excretion was not associated with hepatic cholesterol accumulation and suggests that cholesterol was efficiently removed from the liver at least in part via the bile acid pathway. As expected, TCPOBOP had no significant effect in Car<sup>-/-</sup> mice, neither on fecal sterol excretion nor on hepatic cholesterol concentration (fig. 1B and 1D). Under a standard diet, a similar but less pronounced tendency was observed in TCPOBOP-treated-mice, with an increase in fecal bile acid excretion that was significant for beta- and alpha-muricholic acid species and a non-significant decrease in fecal cholesterol excretion (fig. S1).

**CAR activation induces the coordinated expression of genes involved in bile acid elimination and decreases Abcg5/g8 expression in WT but not Car<sup>-/-</sup> mice.**

In order to gain insights into the mechanisms that could account for the dramatic changes in bile acid and cholesterol excretion, we measured the hepatic expression of major genes involved in bile acid and cholesterol metabolism. In WT mice, CAR activation was associated

with the coordinated induction of genes involved in hydroxylation (Cyp3a11, Cyp2B10, Cyp39a1) (fig. 2A), conjugation (Sult2a1) (fig. 2B) and transport (Mdr1a, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Oatp1a4) of bile acids (fig. 2C). mRNA levels of the bile salt export pump (Bsep or Abcb11), (i.e. the major gene involved in the canalicular excretion of bile acids), were also slightly increased in TCPOBOP-treated animals (fig. 2D). The expression of the main genes involved in bile acid synthesis, Cyp7a1, Cyp27a1 and Cyp8b1 were moderately affected with only Cyp8b1 mRNA levels that were slightly increased in TCPOBOP-treated mice (fig. 2E). In parallel, we found that the expression of the Abcg8/g5 cholesterol transporters was significantly decreased in TCPOBOP-treated mice (fig. 2F). Altogether, the upregulation of genes involved in bile acid hydroxylation, conjugation and excretion, and the repression of genes involved in canalicular cholesterol excretion, were consistent with the observed alterations in neutral sterol and bile acid output. As expected, TCPOBOP treatment had no effect on gene expression in *Car*<sup>-/-</sup> mice (fig. 2).

**Sustained TCPOBOP treatment increases fecal bile acid excretion in apoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice.**

In a further step, we wanted to assess the effect of a longer TCPOBOP treatment in two well characterized hypercholesterolemic mouse models: ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice. Animals were fed a western-type diet for two months and were treated weekly with TCPOBOP. As observed in WT mice, TCPOBOP treatment induced a marked decrease in the fecal cholesterol output in ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice (fig. 3A and 3C). Biliary concentration of cholesterol were also reduced in apoE<sup>-/-</sup> treated with TCPOBOP (Table SII). Again, bile acid output was dramatically increased by TCPOBOP treatment, and all major bile acid species were significantly higher in the feces of TCPOBOP-treated animals (fig. 3B and 3D). In both ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice, no detectable amounts of bile acids were recovered in the urine of

control or TCPOBOP-treated mice (not shown). As observed in WT mice, CAR activation was associated with a reduction of hepatic cholesterol concentrations in ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice (fig. 3E). Interestingly, hepatic levels of 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one, a marker of the activity of the bile acid synthesis pathway were markedly increased in TCPOBOP-treated mice (fig. 3F) suggesting an increased conversion of cholesterol into bile acids [6].

In the liver of apoE<sup>-/-</sup> mice, TCPOBOP treatment induced changes in the pattern of gene expression (fig. 4) which as observed in WT mice were characterized by a coordinated induction of genes involved in bile acid hydroxylation, conjugation, and excretion as well as a reduction of the Abcg5/g8 cholesterol transporters. Unlike WT mice, Cyp7a1 and Cyp27a1 mRNA levels increased in TCPOBOP-treated apoE<sup>-/-</sup> mice with no changes for Cyp8b1 mRNA levels (fig.4D). The induction of Cyp7a1 observed at the protein level (fig.4F) was more pronounced while no changes were observed for Cyp27a1. A reduction of Abcg8 protein levels was also observed (fig.4F).

Since the fecal bile acid output is highly dependent on the efficiency of intestinal bile acid reabsorption, we also measured the expression of major bile acid transporters in the ileum of apoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP. As expected, expression of a typical CAR target gene such as Cyp2b10 was dramatically increased after TCPOBOP treatment (fig.5A). As observed in the liver, CAR activation reduced the expression of Abcg5/g8 cholesterol transporters at the mRNA and protein levels (fig.5B and 5D). Interestingly, while TCPOBOP treatment did not affect Ost alpha/beta expression, mRNA levels of the ileal apical sodium-dependent bile acid transporter (Asbt), (*i.e.* the major gene involved in bile acid reabsorption), were significantly reduced (fig. 5C). A small reduction of Asbt protein levels was also observed (fig.5 D.) It suggests that a decrease in intestinal bile reabsorption could also contribute to the overall phenotype. In accordance with this hypothesis, we observed that while the concentration of bile acids in the liver did not differ, the percentage of secondary

bile acids (including deoxycholic, lithocholic, hyodeoxycholic and ursodeoxycholic acids) was significantly reduced in TCPOBOP-treated mice. These results come in further support of decreased bile acid reabsorption (figure SII). The concentration of tri-hydroxylated bile acids in the bile was increased while the proportion of di-hydroxylated tauro-conjugated bile acids was significantly reduced in the TCPOBOP group (Table SII). Surprisingly, sulfated bile acids were barely detectable in the bile of either vehicle or TCPOBOP-treated animals and even decreased in this latter group despite the marked induction of *Sult2a1* by TCPOBOP treatment. Finally, the *Fgf15/Fgfr4* pathway was not affected by CAR activation (figure SIII).

#### **CAR activation stimulates the elimination of HDL-derived cholesterol into the feces.**

To assess whether CAR activation could affect the elimination of endogenous cholesterol derived from peripheral tissues into the feces, we used a kinetic approach with high-density lipoproteins (HDL) labelled with  $^3\text{H}$ -cholesteryl esters in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice (figure SIV) and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice (fig. 6). As mediators of the reverse cholesterol transport pathway, HDL are thought to be a major source of biliary cholesterol and bile salts [15]. Before the experiment, total plasma cholesterol and HDL cholesterol concentrations were determined and did not differ significantly between vehicle and TCPOBOP-treated mice (Table SIII).  $^3\text{H}$ -CE-HDL were injected into the caudal vein of the mice and the plasma kinetics of HDL as well as the appearance of the tracer in the liver and the feces was monitored over a 48-h period. As shown in figures 6A and SIIIA, plasma kinetics of HDL were not significantly different between control and TCPOBOP-treated animals. Accordingly, hepatic mRNA levels of the scavenger receptor BI, the major receptor involved in hepatic cholesterol uptake, were not statistically altered by the TCPOBOP treatment (not shown). In contrast, as compared to vehicle-treated mice, the amount of radioactivity present in the liver of TCPOBOP-treated animals was significantly lower at both 24h and 48h after injection suggesting an increased

elimination of the tracer (fig. 6B and SIVB). In accordance with this hypothesis, we found an increase in the total amount of radioactivity excreted in the feces. This was observed at both 24h and 48h and in the two animal models (fig. 6C and 6D). When distinguishing between bile acids and neutral sterols, we found that the higher amounts of the tracer in the feces were related to an increase in the radioactivity associated with bile acids only. TCPOBOP-treated *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice excreted 40% more <sup>3</sup>H-bile acid into their feces ( $P < 0.05$ ) over 24 and 48 h, while <sup>3</sup>H-neutral sterols were not significantly different (fig. 6C and D and fig. SIII C and D). In all cases no detectable amounts of radioactivity were retrieved in urines at 24h and 48h time (not shown).

**Sustained CAR activation reduces whole body cholesterol and atherosclerotic lesions.**

The observation that CAR agonism increases the last step of reverse cholesterol transport led us to assess whether long-term CAR activation was able to induce changes in whole-body cholesterol pool. As shown in figure 7A, *ApoE*<sup>-/-</sup> mice treated with the CAR agonist for two months displayed significantly lower cholesterol levels in the whole body. In accordance with a beneficial impact of CAR on cholesterol homeostasis, analysis of aortic lesions in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice showed a reduced lesion area in aortic arches and descending aorta of TCPOBOP treated-animals (fig. 7B).



### Discussion

Previous studies have shown that administration of a CAR agonist to mice is able to stimulate the detoxification of bile acids under cholestatic conditions. However, the effect of CAR on neutral sterol and bile acid output is unknown. We report here for the first time that pharmacological activation of CAR in mice fed a western-type diet reduces the fecal output of cholesterol, but dramatically increases the fecal excretion of bile acids and reduces cholesterol concentration in the liver. Moreover, by conducting a kinetic analysis of HDL cholesteryl esters, CAR agonism was found to increase the last step of the reverse transport of cholesterol, *i.e.* excretion of cholesterol derived from HDL into the feces *in vivo*. ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice treated with the specific CAR agonist TCPOBOP had significantly higher HDL cholesterol-derived <sup>3</sup>H-bile acids in their feces over 24 and 48 h as compared to vehicle-treated mice. Finally, it is shown that long-term CAR activation is associated with a decrease in cholesterol content in the whole body and decreases of atherosclerotic lesions.

The role of CAR in bile acid detoxification was recently highlighted by several independent studies. Indeed, Car-deficient mice showed an exacerbation of liver damage associated with cholestasis [7, 9], while in contrast CAR activators were found to prevent, at least in part, the deleterious effects of bile acid accumulation or overload [7, 10]. Most of these studies specifically addressed the role of CAR in models of cholestasis (bile duct ligation) [9, 10] or exogenous bile acid loading (diets enriched with lithocholic acid and cholic acid) [7, 8]. In contrast, much less is known about the impact of CAR on cholesterol and bile acid metabolism in a context of dietary cholesterol overload. Indeed, cholesterol is the primary bile acid precursor and CAR-mediated stimulation of bile acid detoxification pathways is likely to affect cholesterol homeostasis. There it is demonstrated for the first time that CAR activation is associated with a dramatic 3-fold increase in the amount of bile acids

excreted in the feces of WT, ApoE<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet containing 0.15 % cholesterol. A recent study reported that CAR activation is able to stimulate the urinary excretion of hydrophilic bile acid derivatives under conditions of bile duct ligation [10]. Since in the present study no evidence for urinary elimination of bile acids after CAR activation could be brought, it suggests that this CAR-stimulated pathway mainly operates under cholestatic conditions.

Increased excretion of bile acids in the feces was associated with the coordinated induction of several genes involved in bile acid metabolism in the liver. Most of these genes were already recognized as CAR targets. As previously described, we found that expression of genes involved in hydroxylation (Cyp2B10, Cyp3a11), sulfation (Sult2a1) [16] and excretion (Mrp2/Abcc2, Mrp3/Abcc3, Mrp4/Abcc4, Mdr1a/Abcb1a and Bsep/Abcb11) of bile acids were markedly induced by the CAR agonist treatment. Interestingly, it has been shown that 3 alpha-sulfated bile acids escape from enterohepatic circulation and are efficiently excreted in the feces [17]. In our model only trace amount of sulfated bile acids were detected in the bile of either groups indicating that this pathway is not playing a significant role in the absence of cholestasis. We also observed that the expression of Asbt, the major intestinal bile acid transporter, was reduced by TCPOBOP treatment suggesting that decreased bile acid reabsorption contributed to the overall phenotype. Unlike most of the previous studies, we also observed that "classical" pathways involved in bile acid synthesis (Cyp7a1, Cyp8b1 and Cyp27a1) were unchanged or even slightly induced in TCPOBOP-treated animals. Induction of Cyp7a1 was even more pronounced at the protein level in TCPOBOP-treated animals and this was associated with a significant 4-fold increase in 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one, (a marker of the activity of the bile acid synthesis pathway) in the liver. Differences in the metabolic context (hypercholesterolemia *versus* cholestasis) are likely to account for this apparent discrepancy. Interestingly, a recent study also observed that CAR activation was

associated with an increased 7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholestene-3-one/ cholesterol ratio in hyperlipidemic mouse liver [18]. Overall, the coordinated induction of genes involved in hydroxylation, conjugation and excretion of bile acids as well as the repression of genes involved in intestinal bile acid reabsorption fits well with the observed alterations in fecal sterol composition. Moreover, it is likely to account for the increased bile acid output in TCPOBOP-treated mice.

Besides bile acids, we observed a reduction in cholesterol output in the feces of CAR agonist-treated mice. It could be explained by the increased conversion of cholesterol into bile acids since we found a reduced cholesterol concentration in the liver. Nevertheless we observed that TCPOBOP treatment repressed the expression of the cholesterol transporters Abcg5 and Abcg8. A similar repression was also recently reported in the literature [4, 18]. ABCG5/G8 transporters work as heterodimers and are major regulators of biliary and intestinal cholesterol excretion. Transgenic mice that over-express Abcg5/g8 displayed an increase in their intestinal neutral sterol output [19] while in contrast Abcg5/g8-deficient mice showed a 50% decrease in the excretion of neutral sterol in their feces [20]. Therefore it is likely that the CAR-mediated inhibition of Abcg5/g8 accounts at least in part for the reduction in neutral sterol output.

Net mass sterol output is dependent on many parameters including dietary cholesterol absorption, cholesterol and bile salt secretion in the bile, direct intestinal cholesterol secretion, bile salt reabsorption as well as cholesterol and bile acid synthesis in the body [21]. Therefore to assess directly whether CAR activation could affect the removal of excess cholesterol from the body, we used a kinetic approach with HDL labelled with  $^3\text{H}$ -cholesteryl esters. The HDL pathway mediates the removal of cholesterol from the peripheral cells, its plasma transport, its uptake in the liver and eventually its biliary excretion either directly or after conversion into bile acids [22]. Although a relevant approach has been recently developed for the kinetic

analysis of the reverse cholesterol transport from macrophages to the feces [23], it should be emphasized that CAR is predominantly expressed in the liver and intestine [24]. We chose in the present study to focus on the last part of the RCT pathway, *i.e.* the secretion of cholesterol derived from HDL into the feces. We found that CAR activation induced a 50% increase in  $^3\text{H}$ -sterol derived from HDL in the feces. This was exclusively due to an increase in  $^3\text{H}$ -bile acids since the amount of  $^3\text{H}$ -neutral sterols remained unchanged. This finding was in accordance with the coordinated induction of genes involved in bile acid metabolism and with the increase in the net mass output of bile acids observed in this study. Therefore CAR emerges as a new nuclear receptor involved in reverse cholesterol transport. Interestingly, other nuclear receptors have recently been shown to stimulate reverse cholesterol transport *in vivo*. For example, pharmacological LXR activation has been shown to enhance the excretion of macrophage-derived  $^3\text{H}$ -cholesterol in the feces [25]. Unlike CAR, LXRs are expressed both in peripheral cells and in the liver and the intestine. Therefore, LXRs are likely to stimulate RCT by acting both on the initial steps (upregulation of cellular cholesterol efflux through ABCG1/ABCA1 induction) and final steps (biliary cholesterol secretion through ABCG5/G8 induction) of the pathway [25]. Moreover, the increased sterol output after LXR activation is mainly due to an increase in neutral sterol rather than bile acid excretion as observed with CAR activation.

In conclusion, the results of the present study identify CAR as a new factor involved in the control of cholesterol and bile acid metabolism under hyperlipidemic conditions. Moreover we provide the first direct evidence that activation of CAR is able to stimulate the final steps of RCT. The emerging role of CAR in cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport opens new perspectives in the treatment of hypercholesterolemia and atherosclerosis.

**Acknowledgments:** We thank Philippe Bastable for manuscript editing, Pr. Ingmar Bjorkhem for the generous gift of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one standard and Dr. Hélène Poirier and Pr. Philippe Besnard for providing anti Asbt antibody.

**Competing interests:** The authors have no conflict of interest to disclose

**Funding:** This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne, the Fondation de France, the Université de Bourgogne the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) ATHEROLIP.

**References:**

- [1] Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, et al. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev* 2006;58:742-759.
- [2] Qatanani M, Moore DD. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Curr Drug Metab* 2005;6:329-339.
- [3] Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 2000;407:920-923.
- [4] Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18831-18836.
- [5] Masson D, Qatanani M, Sberna AL, Xiao R, Pais de Barros JP, Grober J, et al. Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *J Lipid Res* 2008;49:1682-1691.
- [6] Rezen T, Tamasi V, Lovgren-Sandblom A, Bjorkhem I, Meyer UA, Rozman D. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC Genomics* 2009;10:384.
- [7] Beilke LD, Aleksunes LM, Holland RD, Besselsen DG, Beger RD, Klaassen CD, et al. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1035-1045.
- [8] Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB, Jr., Kliewer SA, et al. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem* 2003;278:45062-45071.
- [9] Stedman CA, Liddle C, Coulter SA, Sonoda J, Alvarez JG, Moore DD, et al. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2063-2068.
- [10] Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* 2005;42:420-430.
- [11] Zhang J, Huang W, Qatanani M, Evans RM, Moore DD. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 2004;279:49517-49522.
- [12] Saini SP, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, et al. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol Pharmacol* 2004;65:292-300.
- [13] Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, et al. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* 2004;279:22250-22257.
- [14] Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* 2000;20:2951-2958.

- [15] Jolley CD, Dietschy JM, Turley SD. Induction of bile acid synthesis by cholesterol and cholestyramine feeding is unimpaired in mice deficient in apolipoprotein AI. *Hepatology* 2000;32:1309-1316.
- [16] Huang J, Bathena SP, Tong J, Roth M, Hagenbuch B, Alnouti Y. Kinetic analysis of bile acid sulfation by stably expressed human sulfotransferase 2A1 (SULT2A1). *Xenobiotica*;40:184-194.
- [17] Miyata M, Watase H, Hori W, Shimada M, Nagata K, Gonzalez FJ, et al. Role for enhanced faecal excretion of bile acid in hydroxysteroid sulfotransferase-mediated protection against lithocholic acid-induced liver toxicity. *Xenobiotica* 2006;36:631-644.
- [18] Rezen T, Tamasi V, Lovgren Sandblom A, Bjorkhem I, Meyer UA, Rozman D. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse liver. *BMC Genomics* 2009;10:384.
- [19] Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110:671-680.
- [20] Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16237-16242.
- [21] van der Velde AE, Vriens CL, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, et al. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007;133:967-975.
- [22] Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S189-194.
- [23] Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 2003;108:661-663.
- [24] Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 2000;275:15122-15127.
- [25] Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006;113:90-97.

**Figure legends**

**Figure 1: Fecal sterol output and hepatic cholesterol concentration in WT and Car<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** WT and Car<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet were treated weekly by i.p. injection of TCPOBOP or vehicle only for two weeks. **A and B: Fecal sterol excretion in WT and Car<sup>-/-</sup> mice.** Feces were collected over a 24-h period five days after the last i.p. injection. Bile acid and neutral sterol contents of the feces were determined by GC-MS. **C and D: Hepatic cholesterol concentration in WT and Car<sup>-/-</sup> mice.** Hepatic cholesterol concentration was determined by an enzymatic method. (\* indicate significant differences from mice treated with the vehicle only, Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=4$  in each group).

**Figure 2: Relative mRNA levels of genes involved in bile acid hydroxylation, conjugation, excretion and synthesis in WT and Car<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Relative mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. Data were standardized with GAPDH and mRNA levels in mice treated with vehicle were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD. **A:** genes involved in bile acid hydroxylation, **B:** genes involved in bile acid conjugation, **C and D:** genes involved in bile acid transport **E:** genes involved in bile acid synthesis, **F:** genes involved in cholesterol excretion. (\*Significantly different from untreated group, Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=4$  in each group)

**Figure 3: Fecal sterol output and hepatic cholesterol concentration in Ldlr<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Ldlr<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet were treated weekly by i.p. injection of TCPOBOP or vehicle only for 8 weeks. **A and C: Fecal cholesterol excretion, B and D: Fecal bile excretion, E: Hepatic cholesterol**



**concentration. F: Hepatic 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one concentration.** (\* indicates significant differences from mice treated with the vehicle only (Student's t test,  $p < 0.001$ ,  $n=10$  in each group for Ldlr<sup>-/-</sup>,  $n=9$  in each group for ApoE<sup>-/-</sup>).

**Figure 4: Relative levels of genes involved in bile acid hydroxylation, conjugation, transport and synthesis in ApoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Relative mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. Data were standardized with GAPDH and mRNA levels in mice treated with vehicle were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD. **A:** genes involved in bile acid hydroxylation, **B:** genes involved in bile acid conjugation, **C:** genes involved in bile acid transport, **D:** genes involved in bile acid synthesis **E:** genes involved in cholesterol excretion. (\*Significantly different from untreated group, Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=8$  in each group) **F: Relative levels Cyp7a1, Cyp27a1 and Abcg8 proteins.** Relative protein (left panel) levels were determined by Western blotting using specific antibodies (see right panel) and were normalized with beta actin (\*Significantly different from untreated group, Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ,  $n=5$  in each group)

**Figure 5: Relative levels of genes involved in intestinal bile acid reabsorption, and cholesterol excretion in ApoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Relative mRNA levels of selected genes were determined by real-time RT-PCR. Data were standardized with GAPDH and mRNA levels in mice treated with vehicle were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD. **A:** genes involved in bile acid hydroxylation, **B:** genes involved in cholesterol excretion, **C:** genes involved in bile acid reabsorption, (\*Significantly different from untreated group, Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=8$  in each group) **D: Relative levels of Asbt and Abcg8 proteins.**

Relative protein levels (left panel) were determined by Western blotting using specific antibodies (right panel) and are normalized with beta actin (\*Significantly different from untreated group, Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$  in each group)

**Figure 6: Excretion of  $^3\text{H}$ -cholesterol derived from HDL into the feces of ApoE $^{-/-}$  mice treated with either vehicle or TCPOBOP.**  $^3\text{H}$ -cholesteryl ester-labelled HDL were injected in the caudal vein ( $2 \times 10^6$  dpm in 0.2 mL medium) of TCPOBOP- or Vehicle-treated mice.

**A: Time course of plasma  $^3\text{H}$ -cholesterol decrease.** Blood samples were collected at 0, 24, and 48 h after  $^3\text{H}$ -HDL injection. Data are expressed as percent dpm as compared to T0 (Mean  $\pm$  SEM). **B: Liver  $^3\text{H}$ -tracer accumulation.** 24 h and 48h after HDL injection, mice were euthanized, and a portion of liver was used for  $^3\text{H}$ -tracer quantification. **C and D: Fecal  $^3\text{H}$ -sterol and bile acids excretion over 24 and 48 h.** Feces were collected continuously from 0 to 24 and 48 h and the total amount of radioactivity present in the feces was determined. In parallel, the amount of radioactivity associated with neutral sterol and with bile acids was determined after correction for extraction efficiency (see materials and methods). Values are expressed as mean  $\pm$  SD (\* $P < 0.05$  Vs control group, Student's t test,  $n = 9$  in each group for 24h points,  $n = 4$  in each group for 48h points).

**Figure 7: Whole-body cholesterol content and atherosclerosis lesion in ApoE $^{-/-}$  mice fed a western-type diet and treated or not with TCPOBOP for 2 months.** **A:** Whole body cholesterol content was determined as described in materials and methods. **B:** % surface covered by atherosclerosis lesions was determined by en face analysis of aortic arches and descending aorta stained with Oil-Red O. (Mann-Whitney test)

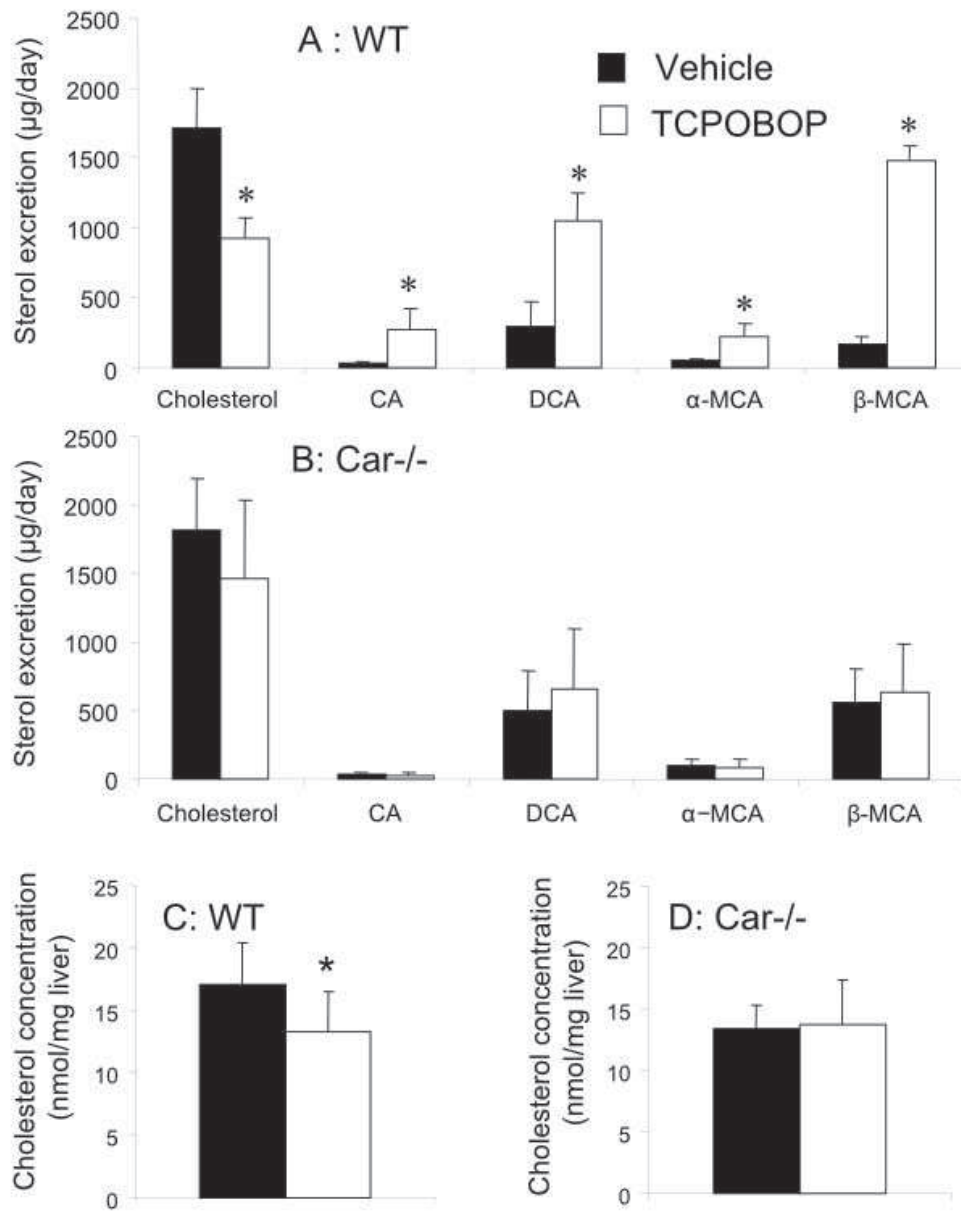
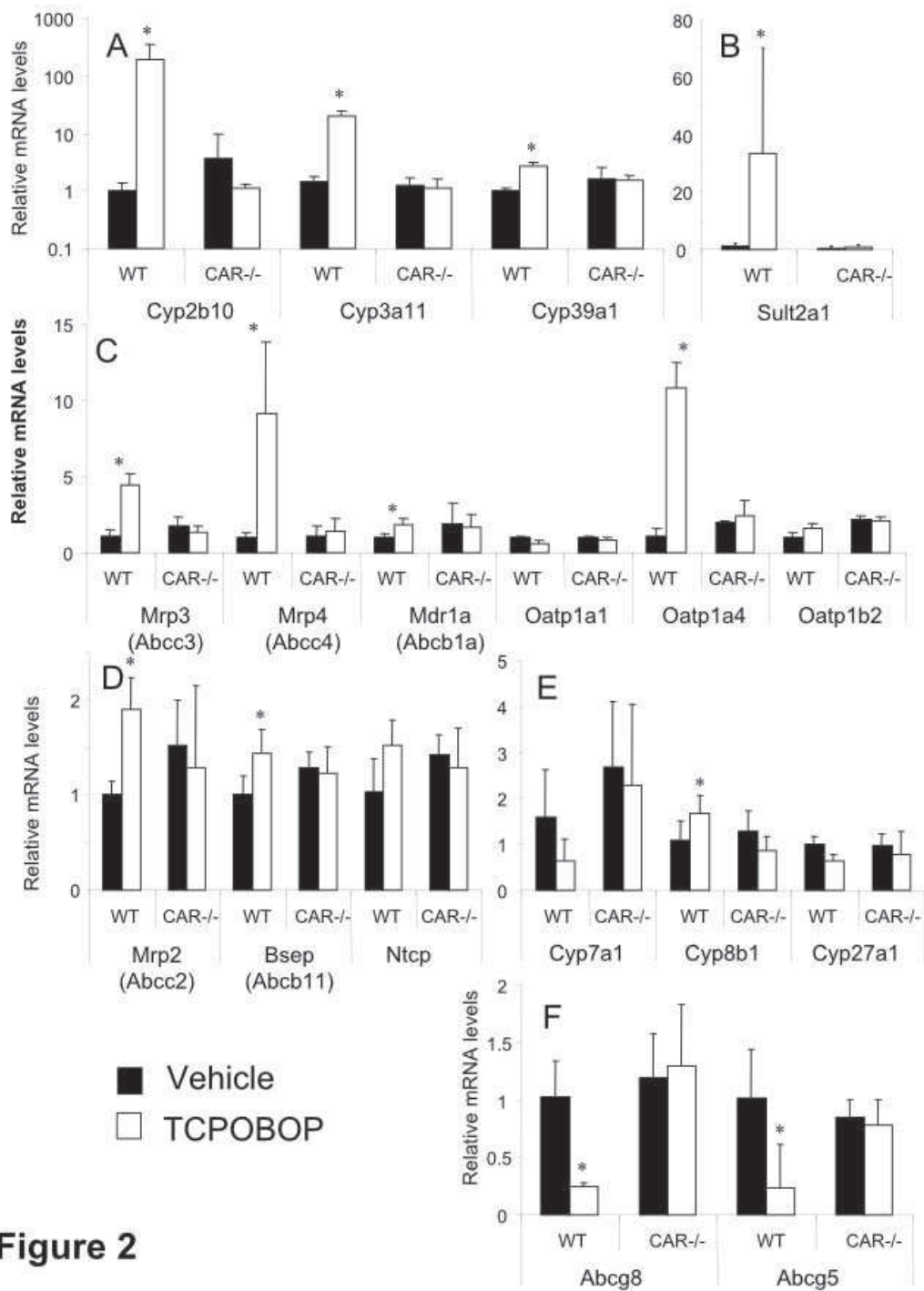


Figure 1



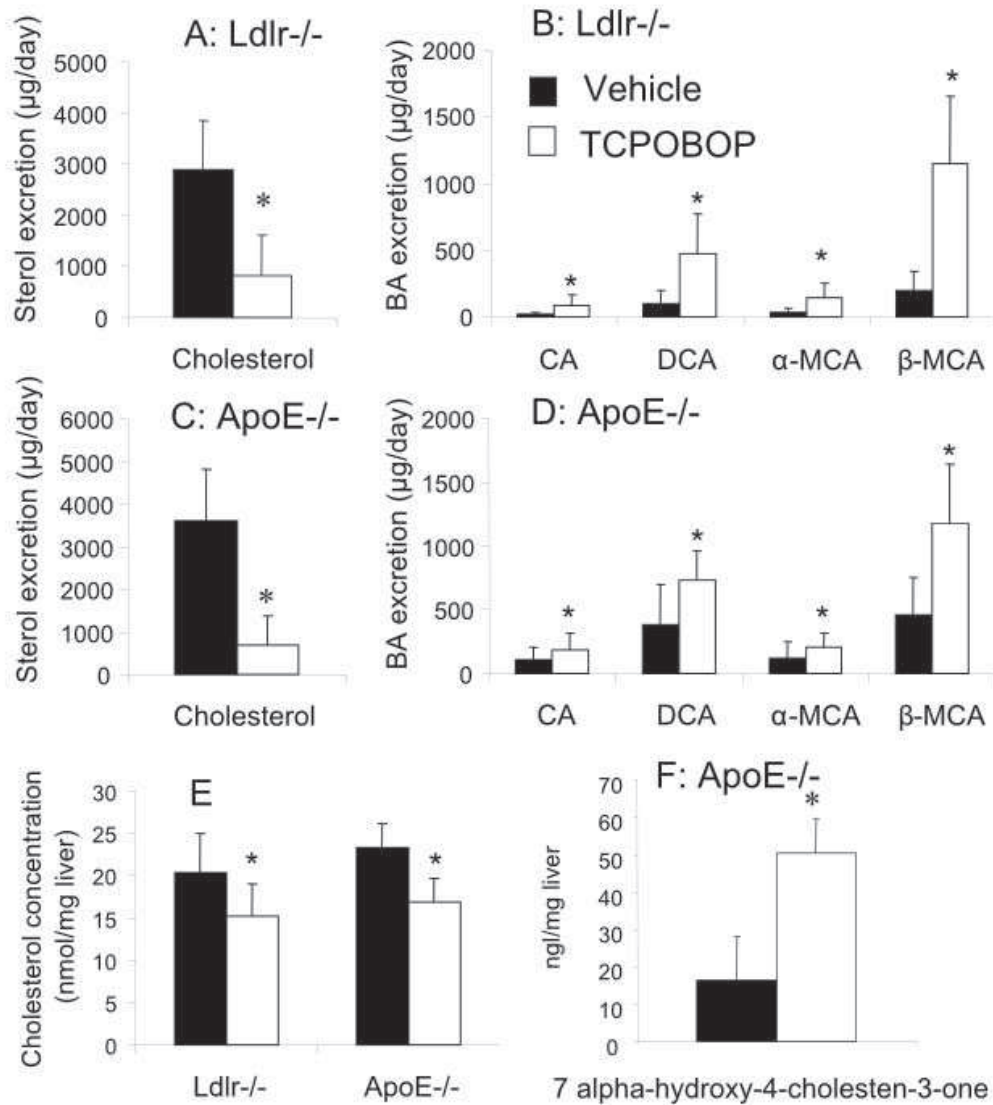


Figure 3

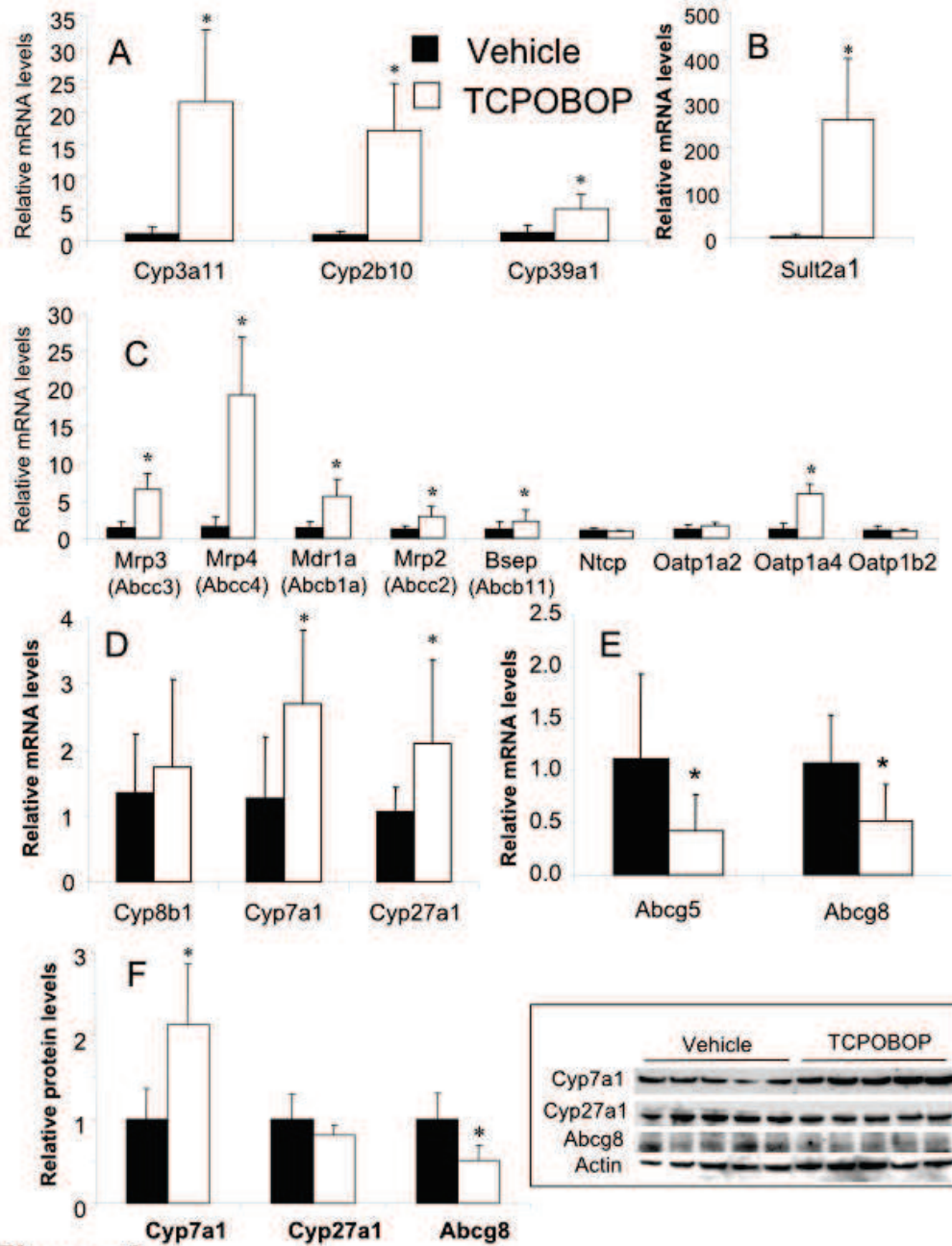
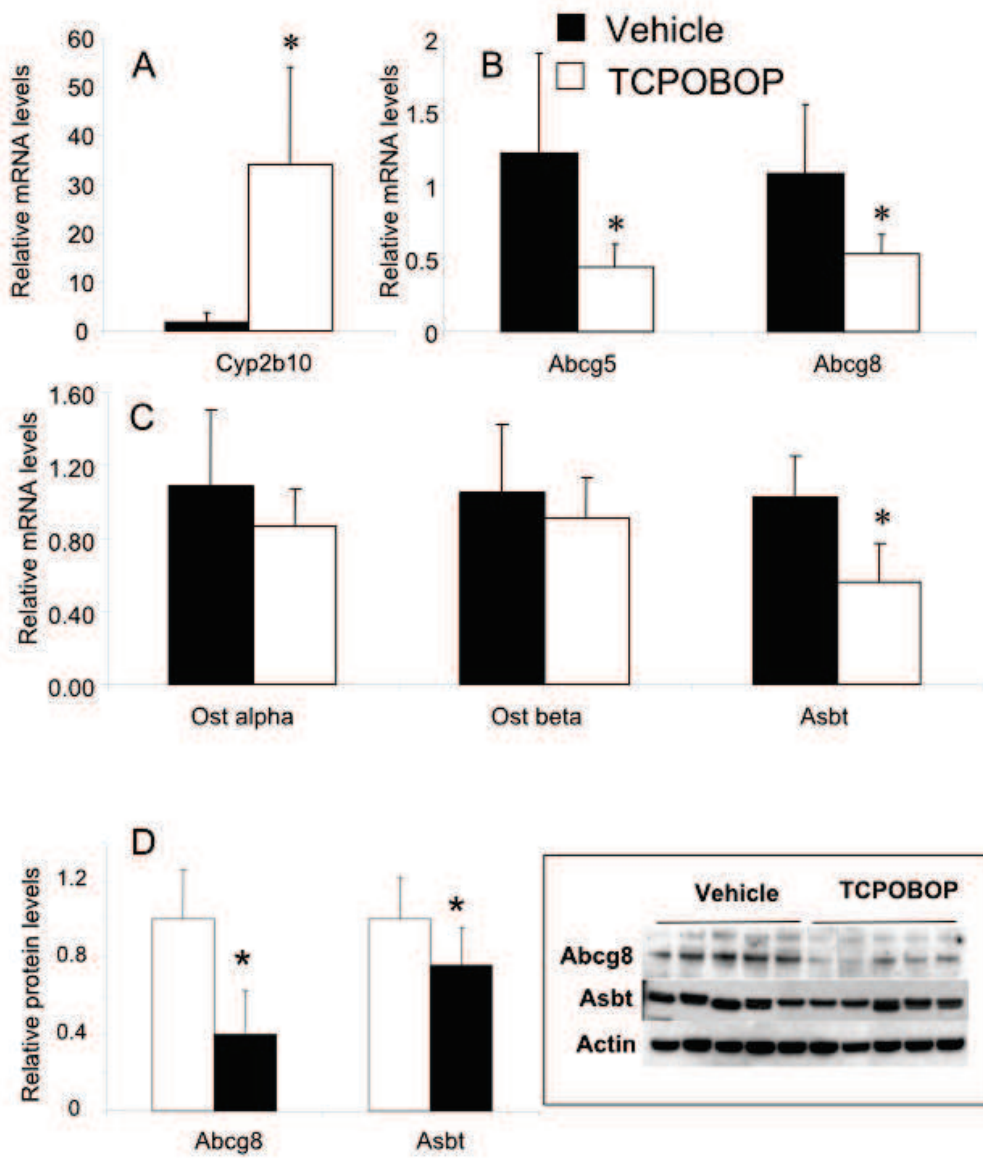


Figure 4

**Figure 5**

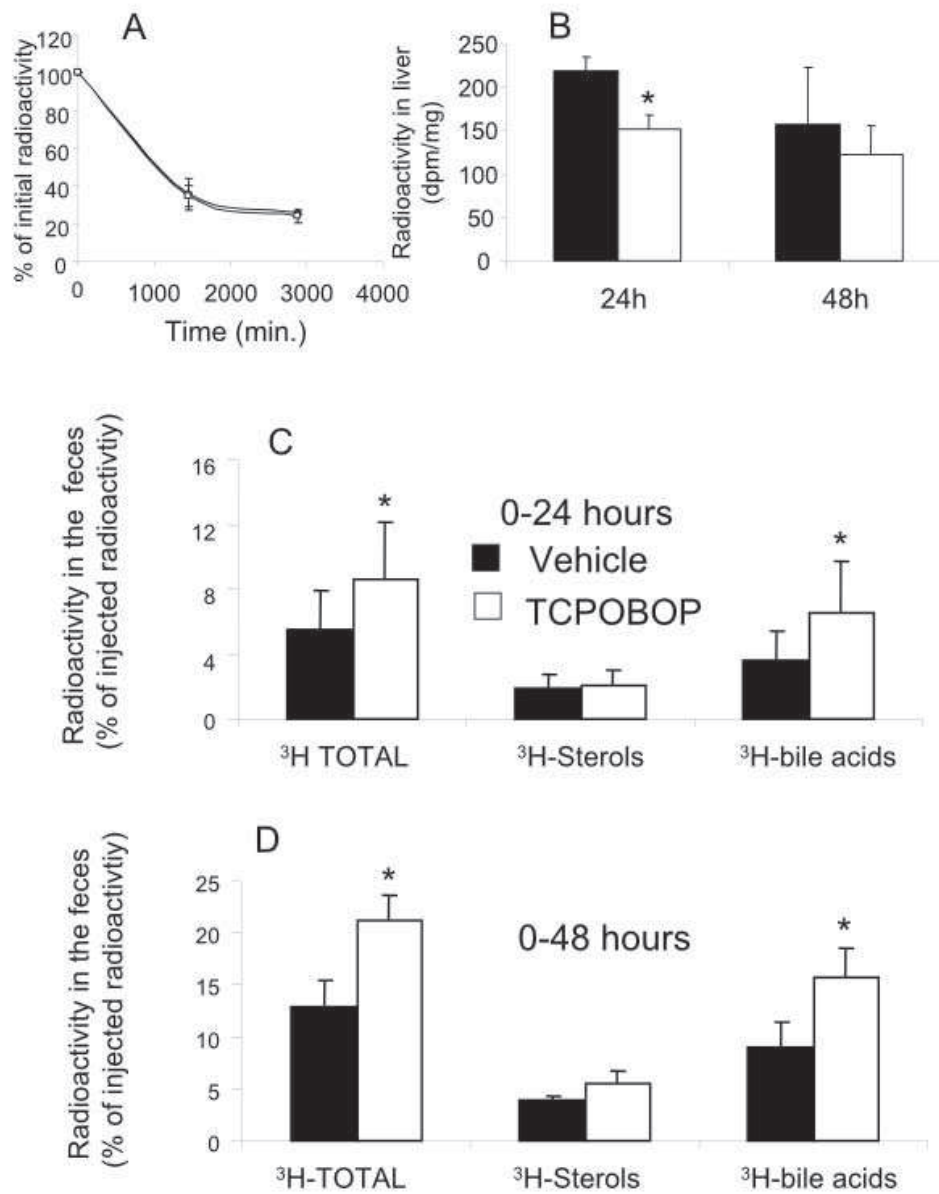


Figure 6



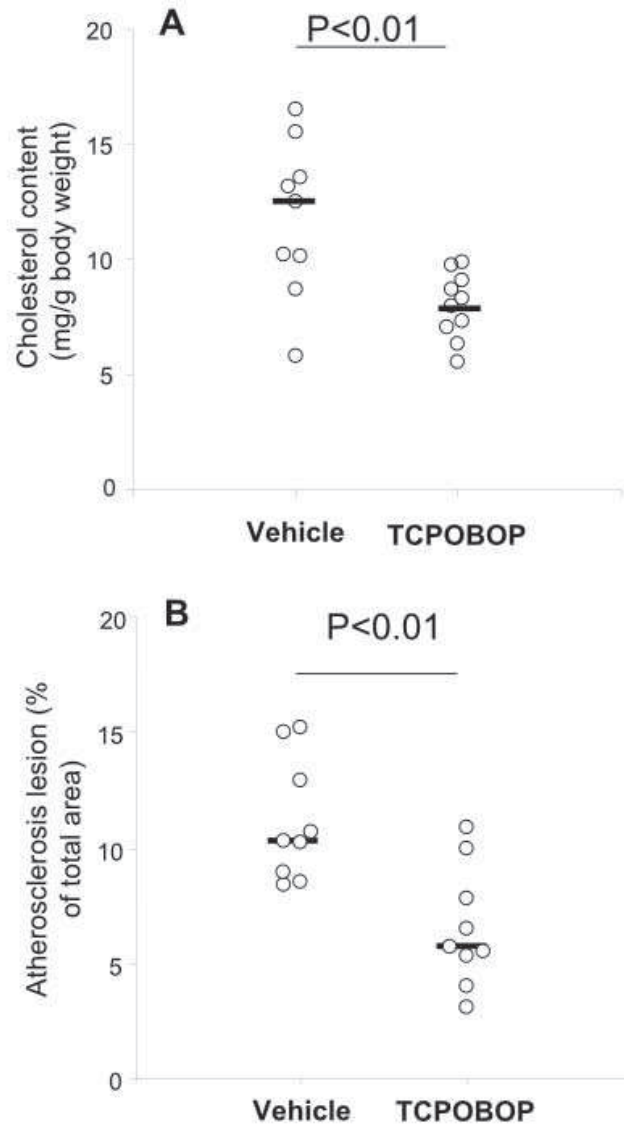


Figure 7

## **Supporting information**

### **Supplementary Materials and Methods**

**RNA isolation and real-time RT-PCR:** Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). One hundred to 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, Random Primers and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen). cDNA were quantified by real-time PCR using a SYBR® Green Real-time PCR kit (Invitrogen) on a LightCycler 2.0 detection system (Roche Diagnostics, Meylan, France). Relative mRNA levels were determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Values are expressed relative to GAPDH levels. The sequences of the oligonucleotides are shown in table SI.

**Western Blot Analysis:** Liver or ileum samples frozen in liquid nitrogen were homogenized and suspended in a RIPA lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitor. 50  $\mu$ g of proteins were separated on polyacrylamide gradient gels (Invitrogen) under reducing conditions and transferred to PVDF membrane, which was blocked for 1h with TBS/twin containing 5% not fat dry milk. Blots was washed and hybridized overnight at 4°C with primary antibodies for Cyp7a1 (H-58 Santa Cruz Biotech) Cyp27a1 (P-17 Santa Cruz), Abcg8 (V-19 Santa cruz), Actin (H-300 Santa cruz) and Asbt (king gift of doctor H el ene Poirier) in TBS/twin After extensive washing, the antigene-antibody complexes were detected using HRP-labelled anti rabbit or antigoat antibodies (1:3000) and a chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotech).

**Sterol and bile acid quantification:** Twenty-four hour production of feces was collected in metabolic cages. The feces were dried, weighed and homogenized. Bile salts and neutral sterol were determined by capillary gas-liquid chromatography as described previously [1, 2] except for the detection step, which was performed by mass spectrometry. The amount of tauro-di-hydroxylated and trihydroxylated bile acids and their sulfated conjugates in the bile was determined by direct injection of the sample in a triple quadrupole mass spectrometer

(6460 Mass spectrometer Agilent Technologies). Multiple reaction monitoring (MRM) with negative polarity was used for acquisition.  $[M-H]^{-}$ →80 transition was used. Tauro-lithocholic acid (barely detectable in the bile in our conditions) was used as internal standard. Cholesterol concentrations in the bile were determined by GC-MS. Biliary phospholipids were quantified by determination of phosphorus concentration by a colorimetric assay [3]. 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one levels were determined by GC-MS as described by Bertolotti et al. [4]

**Plasma and hepatic cholesterol concentration:** Total plasma cholesterol and HDL cholesterol concentrations were determined by an enzymatic assay as previously described [5]. Hepatic cholesterol concentration was determined by an enzymatic method after lipid extraction [5].

**Reverse cholesterol transport:** Mouse high-density lipoproteins (HDL) were labelled with  $^3\text{H}$ -cholesteryl esters as previously described except that  $^3\text{H}$ -cholesteryl ethers were replaced by  $^3\text{H}$ -cholesteryl esters (CE) [6]. On the day of the experiment, the animals were housed in individual metabolic cages and had free access to food and water.  $^3\text{H}$ -CE-labeled HDL (1 X  $10^6$  dpm) were injected into the tail vein and blood samples were collected at 5 min, 24 h, and 48 h after injection. Samples were centrifuged and plasma radioactivity was determined with a scintillation counter. Livers were harvested and weighed at 24 h and 48 h. One aliquot of tissue was weighed, dissolved in NaOH 0.1M and used for scintillation counting. Feces were collected continuously from 0 to 24 h or from 0 to 48 h and were used for total radioactivity determination or for selective extraction of neutral sterols and bile acids.

**Determination of radioactivity in the feces:** Fecal sterol and bile extraction was performed as previously described with slight modifications. Briefly, total  $^3\text{H}$ -radioactivity was determined on fecal samples homogenized in 50% ethanolic extracts.  $^3\text{H}$ -neutral sterol radioactivity was determined after hexane extraction of saponified ethanolic extracts.  $^3\text{H}$ -bile

acid radioactivity was determined as the difference between total and neutral sterol radioactivity.

**Whole-body cholesterol analysis:** Whole-body cholesterol content was measured as previously described [7]. Mice were sacrificed and the gastrointestinal tract was removed and washed out. The mouse bodies including the washed gastrointestinal tract were then digested at room temperature in 150 ml ethanol containing 6.6 % of KOH. After 4 days, the mixture was heated to reduce the volume to 50 mL and was then filtered. The volume was adjusted to 100mL with ethanol, and cholesterol concentration was determined by an enzymatic method [7].

**Atherosclerosis lesions:** Atherosclerotic lesion areas were determined by *en-face* observations. The aortic arch and the thoracic aorta were opened longitudinally, fixed in 10% buffered formaldehyde, pinned out on a black wax surface, and stained with oil red O. The percentage of the plaque area stained by oil red O to the total vessel area was determined by colour thresholding using Photoshop® software.

**Figure SI: Fecal sterol output in WT mice treated or not with TCPOBOP.** WT mice fed a standard diet were treated weekly by i.p. injection of TCPOBOP or vehicle only for two weeks. Feces were collected over a 24-h period five days after the last i.p. injection. Bile acid and neutral sterol contents of the feces were determined by GC-MS.

**Figure SII: Hepatic bile acid content in apoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** A: Hepatic bile concentration. B: Relative proportion of secondary bile acids. C: Relative proportions of individual bile acids species. (Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=4$  in each group).

**Figure SIII: Intestinal Fgf15 and hepatic Fgfr4 mRNA levels in apoE<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Total RNA was extracted from the intestine or liver and mRNA levels of genes were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. Data were standardized with GAPDH and mRNA levels in mice treated with vehicle were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD.

**Figure SIV: Excretion of <sup>3</sup>H-cholesterol derived from HDL into the feces of Ldlr<sup>-/-</sup> mice treated with either vehicle or TCPOBOP.** Ldlr<sup>-/-</sup> mice fed with a western-type diet were treated weekly with the CAR agonist TCPOBOP or vehicle only. After 4 weeks of treatment, <sup>3</sup>H-cholesteryl ester-labelled HDL were injected in the caudal vein ( $2 \times 10^6$  dpm in 0.2 mL medium). **A:** Time course of plasma <sup>3</sup>H-cholesterol decrease. Blood samples were collected at 0, 24, and 48 h after <sup>3</sup>H-HDL injection. Data are expressed as the percent dpm as compared to  $T_0 \pm$ SEM. **B:** Liver <sup>3</sup>H-tracer accumulation. 24 h and 48h after HDL injection, mice were euthanized, and a portion of liver was used for <sup>3</sup>H-tracer quantification. **C and D:** Fecal <sup>3</sup>H-sterol and bile acid excretion over 24 and 48 h. Feces were collected continuously from 0 to

24 and 48 h and total amounts of radioactivity present in the feces was determined. In parallel, the amount of radioactivity associated with neutral sterol and with bile acids was determined after correction for extraction efficiency (see materials and methods). Data are expressed as dpm  $\pm$ SD. \* $P$ <0.05 vs control group, student's t test (\* $P$ <0.05 vs control group, Student's t test,  $n=9$  in each group for 24h points,  $n=4$  in each group for 48h points).

**Table SI : Sequences of the primers used for real time PCR**

Abcb1a-for	GCA ATT GAA AAC TTC CGC ACT G
Abcb1a-rev	GTT GTT GTG TCA CCA AGT AGG CA
Abcb11-for	AAA TCT GGA GAG CTC CTC ACA AA
Abcb11-rev	AAG GAA TTG ACC ATC ATC CCA AC
Abcc4-for	AAG GGA GAA TCG GCT TCA AGG
Abcc4-rev	TTC CAT TCG CAT TTC TGG TGT
Abcc3-for	ACT GTG GGA GAA ATG GTC AAC CT
Abcc3-rev	TCC ATT GAG TGG TAT CAG CAA GA
Abcc2-for	CCT GGT GTC CGT GAT CAC ATT
Abcc2-rev	AGT CCA GAT CAT CGC TTC CCA
Oatp1a1-for	TGA AAC TCC CAT AAT GCC CTT G
Oatp1a1-rev	CAG TGG GAG TTA TGG TCA GGT CA
Oatp1a4-for	AAC TTT GAC GGC TCA GTG TTC A
Oatp1a4-rev	TGT TCT TTT CTC CTG CCA TGT TG
Oatp1b2-for	TTG CTT CAT CAT GGG CAT TG
Oatp1b2-rev	TGA GTT GGA CCC CTT TTCA CA
Ntcp-for	GGG CAT GAT GCC TCT CCT CTT AT
Ntcp-rev	AAA GTG ATG ATC ATG CCT GCC T
Ostp-alpha	AGA CCA ATT ACA GCA TCT CCC CT
Ostp-alpha	TCC TCT TCT TGA TGG GGC AAA
Ost-beta	TGG TCA TGA CAA GCA TGT TCC T
Ost-beta	TTC TCT TTC AAC TCA GGT TCC CC
Cyp7a1-for	CGG CTT CAA ACA TCA CTC GGT
Cyp7a1-rev	TTC TGC GAA GGC ATT TGG ACA
Abcg5-for	GCT AGA GAT GAC AAG GAG GAT GGA
Abcg5-rev	TGG ATC CAA CAC CTC TAT GCT AAA
Abcg8-for	GGC AGG TTT TCT CGA TGA ACT G
Abcg8-rev	TGC CCA CCT TCC ACA TGT C
Sult2a1-for	CTG GCT GTC CAT GAG AGA AT
Sult2a1-rev	GGC TTG GAA AGA GCT GTA CT
Gapdh-for	CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG
Gapdh-rev	GGC CAT CCA CAC TCT TCT GG
Cyp3a11-for	GCC TGG ATT CTA AGC AGA AGC
Cyp3a11-rev	CAG AGC CTC ATC GAT CTC ATC
Cyp2b10-for	AGG AGA AAG TCC AAC CAG AAC G
Cyp2b10-rev	GGA TGA CTG CAT CTG AGT ATG

**Table SII: Bile acid composition in ApoE <sup>-/-</sup> mice treated with the CAR agonist TCPOBOP or DMSO only.** ApoE <sup>-/-</sup> mice fed a high cholesterol diet were treated weekly by i.p. injection of TCPOBOP or solvent only for two months. Bile was collected from the gall bladder after sacrifice. Values are mean  $\pm$  S.D. The asterisks indicate significant differences from mice treated with the vehicle only (Student's t test,  $p < 0.05$ ,  $n=9$  in each group).

	Vehicle (n=9)	TCPOBOP (n=9)
Bile composition (mass %)		
<b>TriOHs bile acids</b>	68.5 $\pm$ 4.3	73.5 $\pm$ 3.5*
<b>DiOHs bile acids</b>	8.42 $\pm$ 0.75	6.33 $\pm$ 1.09*
<b>Bile acid sulfates (TriOHs+DiOHs)</b>	0.61 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.07*
<b>Phospholipids</b>	19.1 $\pm$ 3.3	18.2 $\pm$ 3.1
<b>Cholesterol</b>	3.36 $\pm$ 1.81	1.64 $\pm$ 0.65*

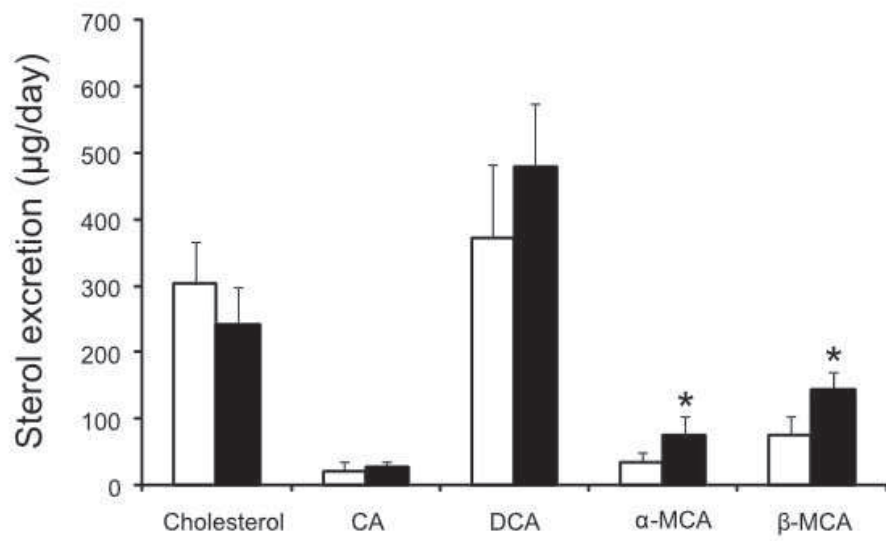


**Table SIII : Total plasma cholesterol and HDL cholesterol concentrations in Ldlr<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a Western type diet and receiving CAR agonist TCPOBOP or the vehicle only.**

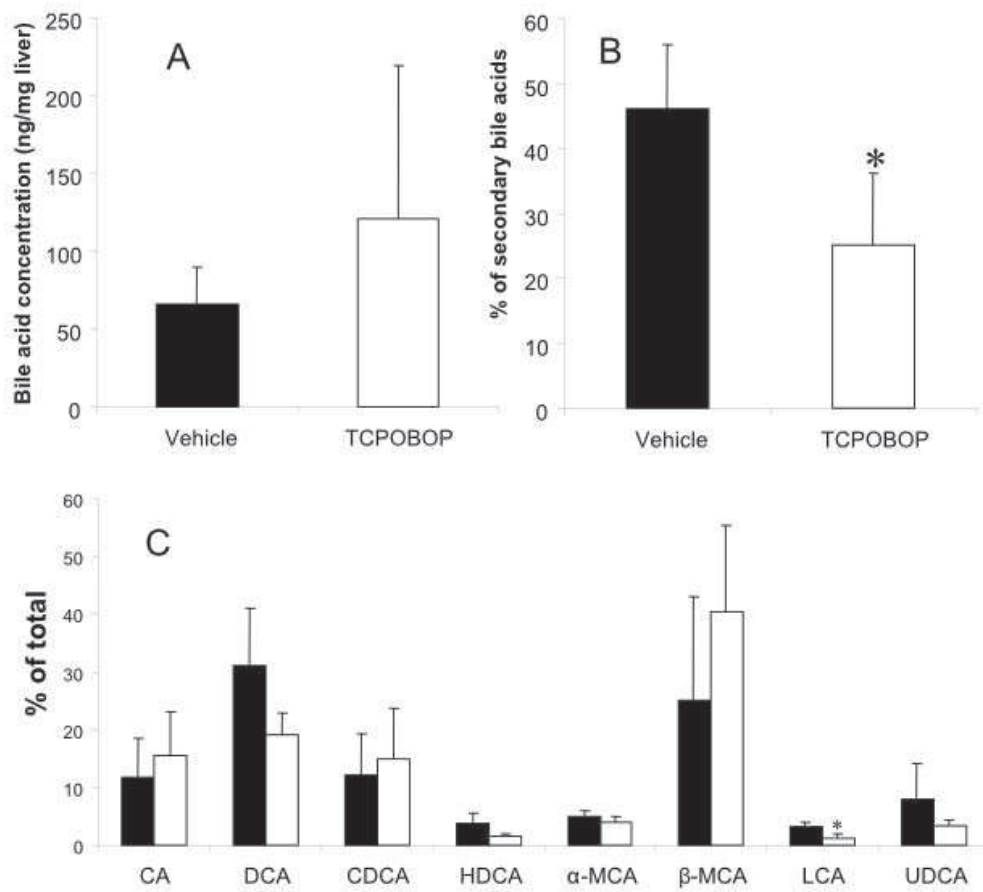
		Total cholesterol	HDL cholesterol
		(mmol/L)	(mmol/L)
Ldlr <sup>-/-</sup>	Vehicle n=10	28.37 ± 9.19	3.26 ± 0.70
	TCPOBOP n=10	25.47 ± 5.45	3.87 ± 0.83
ApoE <sup>-/-</sup>	Vehicle n=10	30.02 ± 9.95	3.20 ± 2.22
	TCPOBOP n=10	30.64 ± 3.57	3.54 ± 0.54

References:

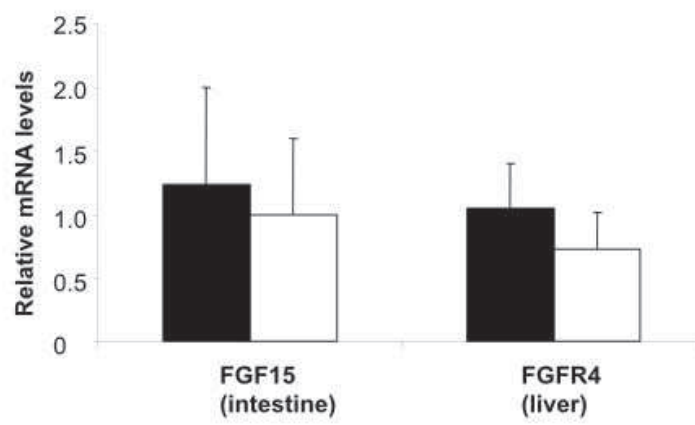
- 1 Batta AK, Salen G, Rapole KR, *et al.* Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *Journal of lipid research* 1999;**40**:1148-54.
- 2 Batta AK, Salen G, Rapole KR, *et al.* Capillary gas chromatographic analysis of serum bile acids as the n-butyl ester-trimethylsilyl ether derivatives. *Journal of chromatography* 1998;**706**:337-41.
- 3 Bottcher CFJ, Van Gent CM, Pries C. A rapid and sensitive sub-microphosphorus determination. *Anal Clin Acta* 1961;**24**:203.
- 4 Bertolotti M, Del Puppo M, Gabbi C, *et al.* Correlation between plasma levels of 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one and cholesterol 7alpha-hydroxylation rates in vivo in hyperlipidemic patients. *Steroids* 2008;**73**:1197-202.
- 5 Masson D, Staels B, Gautier T, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *Journal of lipid research* 2004;**45**:543-50.
- 6 Masson D, Qatanani M, Sberna AL, *et al.* Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *Journal of lipid research* 2008;**49**:1682-91.
- 7 Bradley MN, Hong C, Chen M, *et al.* Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *The Journal of clinical investigation* 2007;**117**:2337-46.



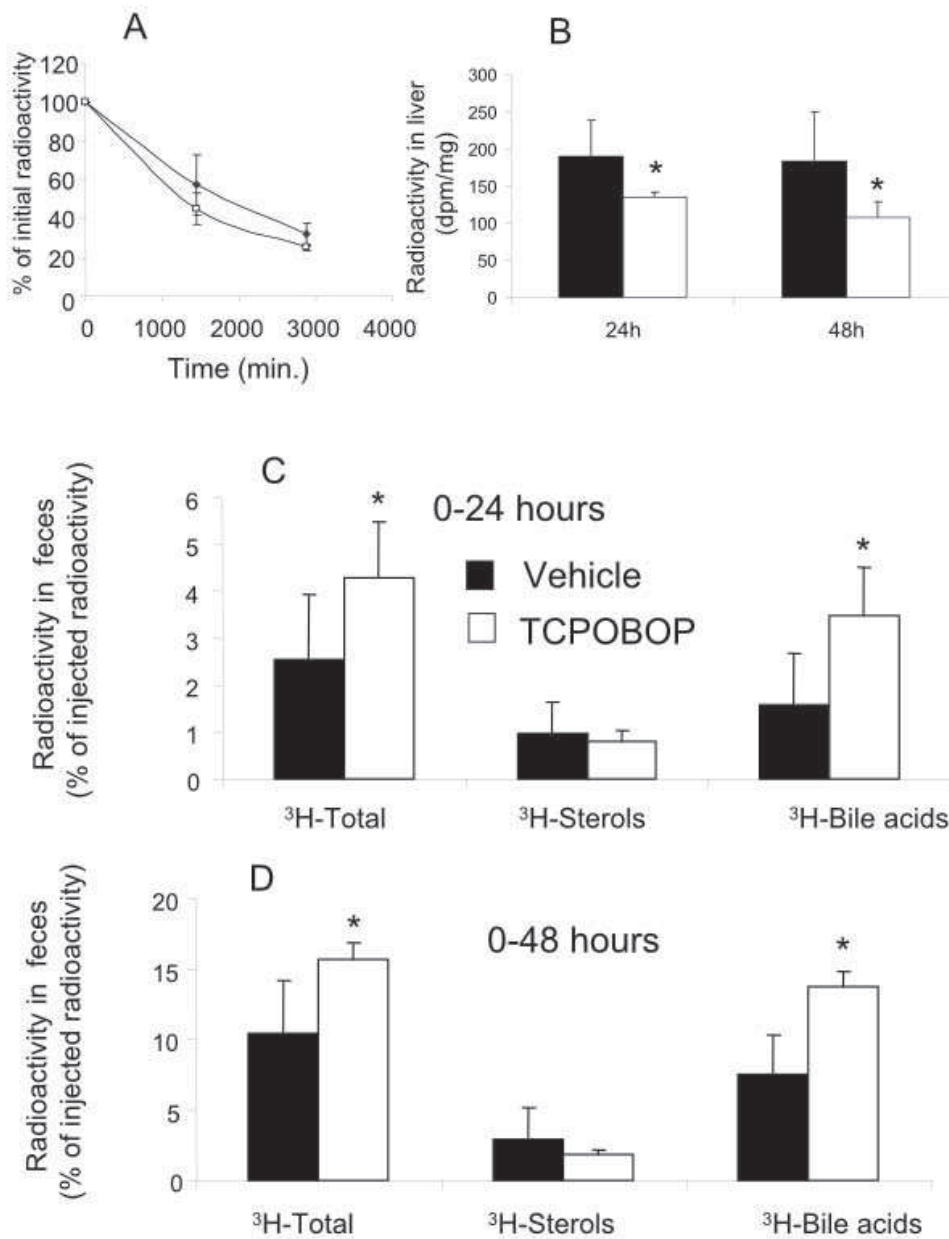
**Figure S1**



**Figure SII**



**Figure SIII**



**Figure SIV**

### **III. Résultats et discussion**

CAR a largement été décrit pour son rôle dans les cholestases et la prévention de l'accumulation des acides biliaires hépatotoxiques. Cependant peu d'éléments étaient connus concernant l'impact de CAR dans des conditions de surcharge en cholestérol. En effet, le cholestérol est le précurseur des acides biliaires et CAR, par son action sur la détoxification des acides biliaires, pourrait vraisemblablement moduler l'homéostasie du cholestérol.

Les résultats de cette étude montrent que l'activation de CAR est associée à une augmentation de l'excrétion des acides biliaires dans des conditions de surcharge alimentaire en cholestérol à la fois chez les souris de type sauvage mais également chez les souris dyslipidémiques déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) et le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (Ldlr<sup>-/-</sup>). Bien qu'une étude récente rapporte que l'activation de CAR stimule l'excrétion urinaire d'acides biliaires hydrophiles après ligature des voies biliaires [409], nous n'avons pas retrouvé de concentration significative en acides biliaires dans les urines des souris contrôles et traitées par TCPOBOP. Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de cholestase, CAR ne joue pas un rôle significatif dans l'élimination urinaire des acides biliaires.

L'augmentation de la concentration et de la quantité d'acides biliaires éliminés dans les fèces chez les animaux traités par le TCPOBOP est associée à la stimulation coordonnée de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des acides biliaires. La plupart de ces gènes sont déjà connus comme étant des cibles de CAR. Comme décrit précédemment, les gènes impliqués dans l'hydroxylation (Cyp2b10, Cyp3a11), la sulfatation (Sult2a1) [449] et l'excrétion (Mrp2/Abcc2, Mrp3/Abcc3, Mrp4/Abcc4, Mdr1a/Abcb1a et Bsep/Abcb11) des acides biliaires sont significativement induits par le TCPOBOP. Bien que les formes 3 alpha sulfatées ne retournent pas dans la circulation entéro-hépatique et soient éliminées dans les fèces en conditions de cholestase [450], nous n'avons pas retrouvé de quantité significative d'acides biliaires sulfatés dans nos conditions ce qui laisserait penser que cette voie de détoxification ne devient vraiment active que sous des conditions de cholestase. De manière importante, l'expression d'Asbt, transporteur principal des acides biliaires au niveau intestinal, est réprimée par le traitement, suggérant que la diminution de la réabsorption intestinale des acides biliaires contribue au phénotype observé.

A la différence des études précédemment menées, l'activation de CAR affecte peu l'expression des gènes impliqués dans la voie classique de synthèse des acides biliaires (Cyp7a1, Cyp8b1 and Cyp27a1) avec une induction significative de Cyp7a1 néanmoins retrouvée après 8 semaines de traitement. En revanche, l'induction de Cyp7a1 est plus prononcée au niveau protéique chez les animaux traités. Cette induction est confirmée par l'augmentation significative du 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one, marqueur de l'activité de synthèse des acides biliaires (et notamment de l'activité 7-alpha-hydroxylase). Les différences observées avec les études précédentes sont vraisemblablement attribuables au contexte métabolique (cholestase contre hypercholestérolémie). De plus, l'effet de CAR sur ces gènes impliqués dans la biosynthèse des acides biliaires est modéré et particulièrement par rapport aux autres gènes cibles de CAR. Une hypothèse possible est que la synthèse des acides biliaires est déréprimée secondairement en réponse à la perte fécale en acides biliaires. Nos résultats recourent par contre ceux d'une étude plus récente qui a montré que l'activation de CAR était associée à une augmentation du ratio 7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholestene-3-one/cholestérol dans le foie des souris hyperlipidémiques [451].

De façon globale, l'induction coordonnée des gènes impliqués dans l'hydroxylation, la conjugaison et l'excrétion des acides biliaires ainsi que la répression du transporteur intestinal Asbt correspondent aux altérations de la composition en stérols des fèces et à l'augmentation de l'excrétion des acides biliaires

Parallèlement à l'effet sur les acides biliaires, nous avons observé que l'activation de CAR diminue l'excrétion fécale des stérols neutres et plus spécifiquement du cholestérol. Ce phénomène peut être expliqué par une meilleure efficacité de la conversion du cholestérol en acides biliaires. Néanmoins, le traitement par TCPOBOP réprime l'expression des transporteurs hépatiques Abcg5/g8. Un phénomène semblable a été rapporté dans un contexte métabolique similaire [435, 451]. Il est donc probable que la répression d'Abcg5/g8 par CAR contribue également à la diminution de l'excrétion fécale en cholestérol. Les transporteurs Abcg5/g8 sont en effet les régulateurs principaux de l'excrétion biliaire de cholestérol au niveau hépatique et intestinal. Les souris transgéniques surexprimant Abcg5/g8 ont une excrétion de stérols neutres augmentée [452] alors que les souris déficientes ont une diminution de 50% du taux d'excrétion [453].



L'excrétion du cholestérol dépend de plusieurs paramètres : les apports alimentaires, les taux de sécrétion des acides biliaires et du cholestérol dans la bile, la sécrétion directe intestinale, la réabsorption intestinale des acides biliaires et le taux de synthèse du cholestérol et des acides biliaires dans l'organisme [454]. Ainsi, pour déterminer directement si CAR peut affecter l'élimination du cholestérol endogène, une étude de cinétique utilisant des lipoprotéines de type HDL radiomarquées avec des esters de cholestérol tritiés a été conduite. Les HDL contribuent à la voie de retour du cholestérol périphérique au foie pour être éventuellement éliminé soit directement dans la bile soit sous forme d'acides biliaires. L'injection de HDL radiomarquées permet ainsi l'étude de la dernière étape du transport réverse du cholestérol. L'activation de CAR induit une augmentation de 50% de l'élimination des esters de cholestérol tritiés dérivés des HDL dans les fèces. Ce phénomène est uniquement attribuable à une augmentation de la radioactivité associée aux acides biliaires alors que la quantité de stérols tritiés éliminés via les stérols neutres est inchangée. Ces résultats sont en accord avec l'induction coordonnée des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires et l'augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires initialement observées. Ainsi CAR est capable de réguler le transport inverse du cholestérol.

D'autres récepteurs nucléaires ont récemment été décrits pour stimuler le transport réverse du cholestérol *in vivo*. Par exemple, l'activation pharmacologique de LXR stimule l'excrétion du cholestérol dans les fèces [455]. A la différence de CAR, LXR est exprimé à la fois au niveau hépatique mais aussi en périphérie, ainsi LXR agit à la fois sur les étapes initiales du transport réverse du cholestérol en stimulant l'efflux cellulaire via les transporteurs Abca1 et Abcg1 (ATP Binding Transporters a1 et g1) mais aussi les étapes finales en stimulant la sécrétion biliaire de cholestérol via Abcg5 et Abcg8 [455]. De plus, l'augmentation de l'excrétion de cholestérol en réponse à l'activation de LXR est associée à une augmentation de l'élimination des stérols neutres plutôt qu'à l'excrétion des acides biliaires comme observé après activation de CAR.

Dans une dernière partie de l'étude nous avons cherché à évaluer si cet impact de CAR sur le transport réverse du cholestérol pouvait avoir des conséquences globales sur l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme et sur l'athérosclérose, pathologie qui se caractérise par des dépôts de cholestérol au niveau des artères. Les souris ApoE<sup>-/-</sup> développent en effet rapidement des lésions athéromateuses sous régime enrichi en cholestérol.

Ainsi, après deux mois de traitement, il apparaît que le pool de cholestérol dans l'organisme des souris ayant reçu le TCPOBOP est significativement diminué. Parallèlement, les premières caractérisations des lésions athéromateuses (analyse en face) montrent une diminution modérée mais significative des lésions chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> traitées par TCPOBOP (cet aspect de l'étude sera développé dans le chapitre suivant).

En conclusion, les résultats rapportés par notre étude identifient CAR comme un nouveau facteur impliqué dans le contrôle du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires en condition hyperlipidique. L'ensemble des résultats indique que l'activation de CAR, par son rôle modulateur de l'expression des gènes impliqués dans la conversion, la transformation et le transport des acides biliaires, est capable de stimuler les étapes finales du transport réverse du cholestérol (*cf.* figures 15 et 16 pages 129 et 130). Ainsi, ce nouveau rôle de CAR dans l'homéostasie du cholestérol et du transport inverse offre de nouvelles perspectives dans le traitement des dyslipidémies et de l'athérosclérose.

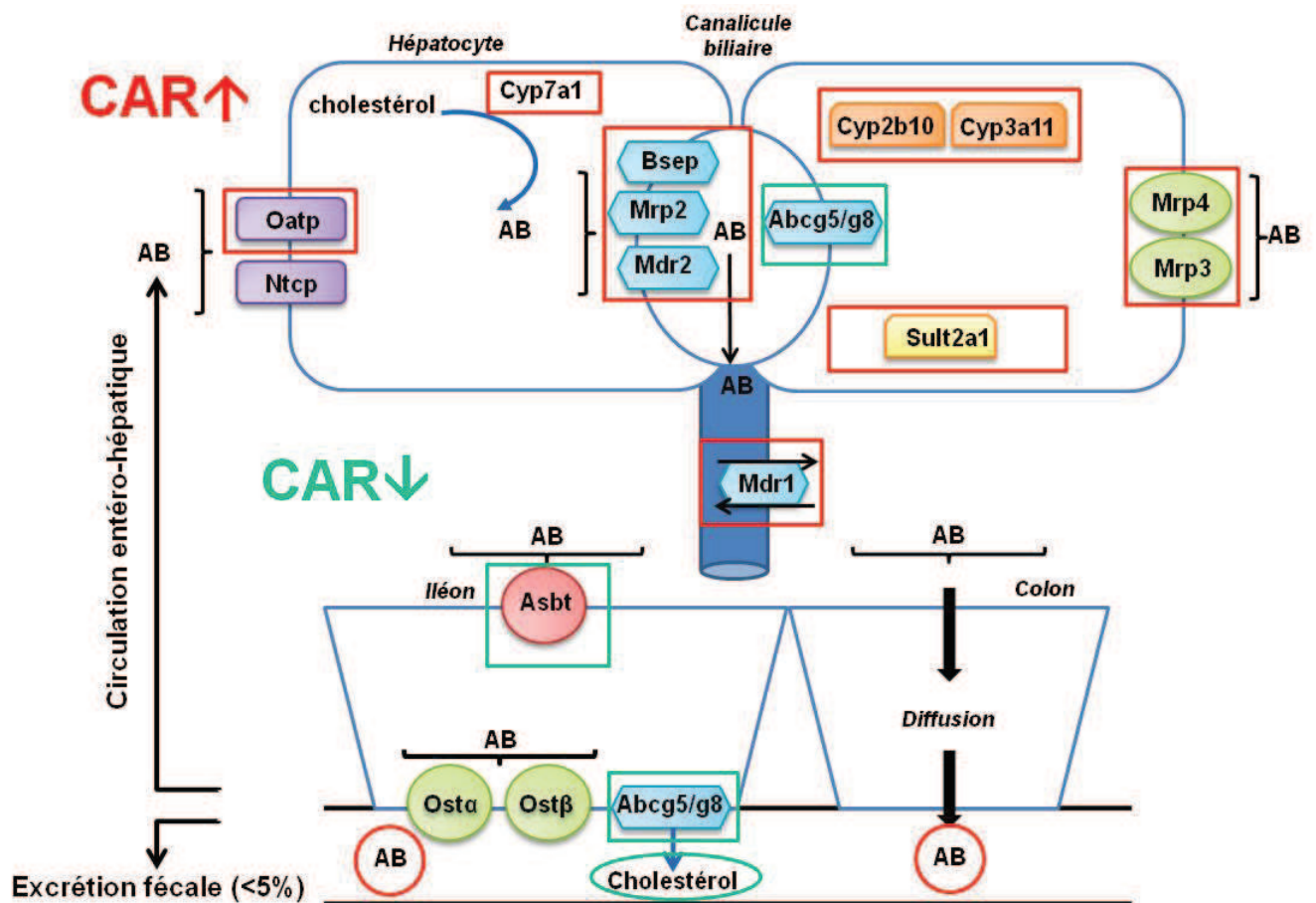
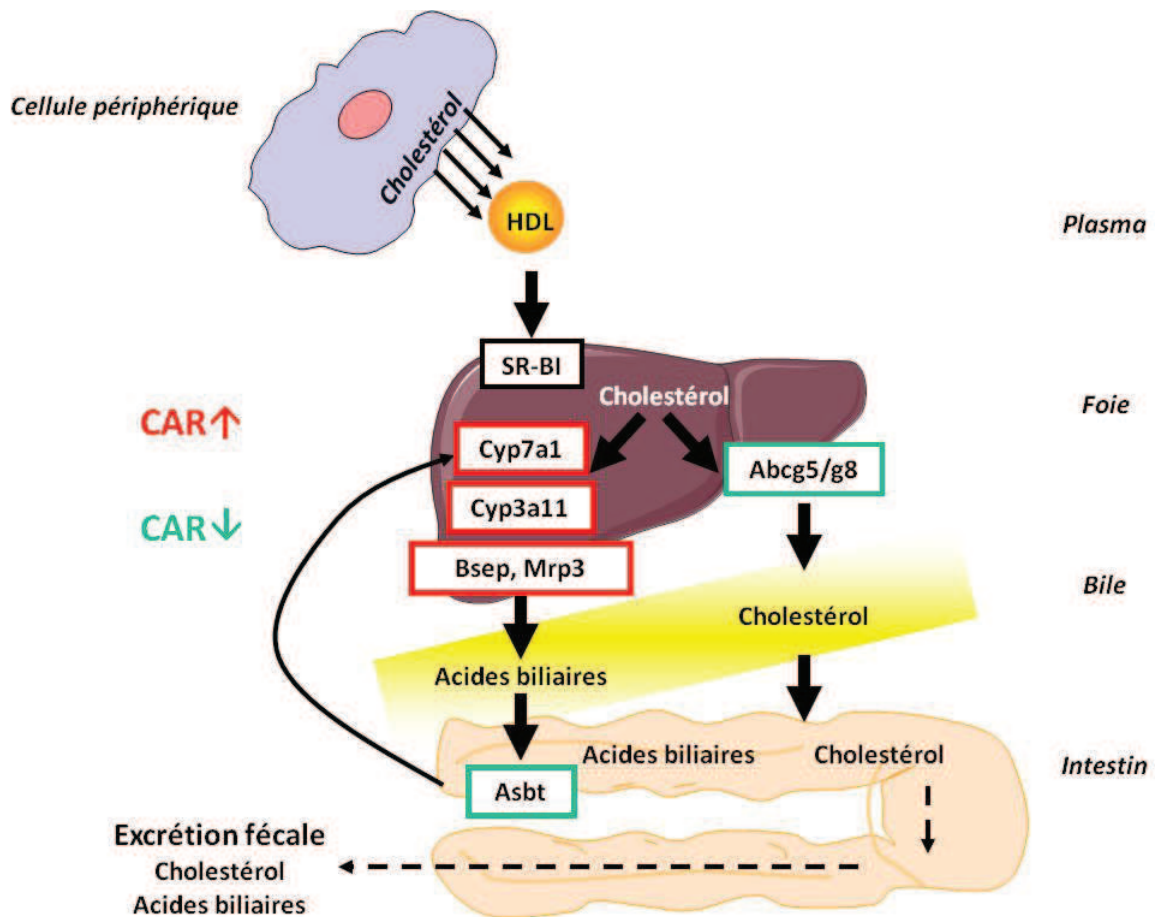


Figure 15 : Régulation coordonnée par le récepteur nucléaire CAR des enzymes impliquées dans le métabolisme biliaire au niveau hépatique et intestinal chez les souris dyslipidémiques *Ldlr*<sup>-/-</sup> sous régime enrichi en cholestérol. L'activation pharmacologique de CAR par le TCPOBOP (1) stimule l'expression de *Cyp7a1*, enzyme limitante de la conversion du cholestérol en acides biliaires, (2) stimule l'expression des enzymes impliquées dans la conjugaison des acides biliaires (*Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Sult2a1*), (3) stimule l'expression des transporteurs canaliculaires *Bsep*, *Mrp2*, *Mdr2*, *Mdr1* impliqués dans l'efflux des acides biliaires, (4) stimule l'expression des transporteurs alternatifs *Mrp3* et *Mrp4*, impliqués dans l'efflux des acides biliaires, (5) stimule l'expression du transporteur basolatéral *Oatp*, impliqué dans la capture hépatique des acides biliaires. D'autre part, CAR diminue l'expression des transporteurs au cholestérol *Abcg5/g8* au niveau hépatique et intestinal, ainsi que l'expression du transporteur aux acides biliaires *Asbt* au niveau intestinal. Ainsi, l'activation de CAR stimule l'excrétion fécale des acides biliaires et diminue l'excrétion du cholestérol. Les gènes cibles et les voies métaboliques stimulés par CAR sont encadrés en rouge et les cibles régulées négativement par CAR sont encadrés en vert.



**Figure 16 : Implication du récepteur nucléaire CAR dans le transport inverse du cholestérol chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> sous régime enrichi en cholestérol.** *Le transport inverse du cholestérol consiste au retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques au foie. Ce transport est réalisé par les HDL. Dans le foie, le cholestérol est éliminé sous forme directe par les transporteurs *Abcg5/g8* ou converti en acides biliaires par *Cyp7a1*. CAR, par son action coordonnée sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme biliaire (*Cyp7a1*, *Cyp3a11*, *Bsep*, *Mrp3*, *Asbt*, *Abcg5/g8*) favorise la conversion et l'élimination du cholestérol sous forme d'acides biliaires. CAR peut ainsi être considéré comme un nouvel acteur du transport inverse du cholestérol. Les gènes cibles stimulés par CAR sont encadrés en rouge et les cibles régulées négativement par CAR sont encadrées en vert.*

## ARTICLE 2

---

Le point de départ de cette étude, c'est à dire l'hypothèse d'un impact significatif de CAR sur le métabolisme lipidique et plus spécifiquement sur celui des lipoprotéines s'est appuyé sur les observations suivantes :

- Des perturbations du bilan lipidique et du risque cardio-vasculaire ont été rapportées chez des patients épileptiques traités par phénobarbital, double agoniste des récepteurs CAR et PXR.
- L'activation de CAR est connue pour stimuler les enzymes de détoxification de phase I et II, qui interviennent dans le catabolisme des xénobiotiques mais aussi dans la conversion du cholestérol en acides biliaires et leur élimination. Par cette voie, CAR pourrait donc indirectement influencer l'homéostasie du cholestérol.
- CAR présente une homologie significative avec d'autres récepteurs de la famille NR1 comme FXR et LXR. L'hypothèse d'un effet direct de CAR sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides par la régulation de l'expression de gènes cibles communs à d'autres récepteurs nucléaires apparentés était donc possible.

### I. Objectifs de l'étude

Le rôle de CAR dans le métabolisme lipidique a fait l'objet de récents travaux rapportant cependant des résultats contradictoires sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides. D'une part, de nombreuses études ont démontré que l'activation pharmacologique de CAR diminuait la triglycéridémie et la stéatose hépatique par inhibition de la lipogenèse hépatique [230, 435-437]. Inversement, il a été rapporté que l'activation pharmacologique de CAR induisait une augmentation des triglycérides plasmatiques chez les souris diabétiques et que cet effet était aboli chez les souris n'exprimant pas CAR [384]. Par ailleurs, les travaux menés par notre équipe (annexe 2) [22] ont montré que le traitement par agoniste CAR de souris de type sauvage et transgéniques surexprimant le gène de l'apolipoprotéine AI était capable de diminuer le cholestérol HDL. Réciproquement, les souris déficientes pour CAR présentent des niveaux de cholestérol HDL plus élevés.

En plus de l'impact sur les HDL, le TCPOBOP induit chez ces souris une réduction des niveaux de lipoprotéines à apolipoprotéine B (apo-B) avec une diminution significative des taux plasmatiques d'apolipoprotéine B et de cholestérol LDL. Etant donné que chez les souris de type sauvage, à la différence de l'Homme, les HDL représentent la classe prédominante, la diminution du taux de LDL ne contribue qu'en faible partie aux effets du TCPOBOP sur la diminution du cholestérol plasmatique total, sous-estimant l'impact réel de CAR sur le métabolisme des lipoprotéines à apo-B. Enfin, les travaux de notre équipe présentés dans le chapitre précédant, démontraient que CAR stimulait le transport réverse du cholestérol chez la Souris avec des conséquences positives en terme d'homéostasie globale du cholestérol et de susceptibilité à l'athérosclérose.

Le but de cette étude était d'étudier sur le long terme les effets de l'activation de CAR sur le métabolisme des lipoprotéines et encore une fois sur l'athérosclérose en portant un intérêt particulier aux lipoprotéines à apo-B dans des modèles murins présentant un profil lipoprotéique plus proche de l'Homme. Ainsi, les souris déficientes pour le gène codant le récepteur aux LDL (Ldlr<sup>-/-</sup>) et l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) ont été placées sous régime enrichi en cholestérol et traitées de façon hebdomadaire par TCPOBOP. Les profils lipoprotéiques ont été déterminés cinq jours après la première injection puis après quatre et huit semaines de traitement. Le développement des lésions athéromateuses a été évalué à la fin du traitement.

## **II. Choix des modèles d'étude**

Les souris de type sauvage présentent un profil lipoprotéique diamétralement opposé à l'Homme et sont peu susceptibles à l'athérosclérose induite par l'alimentation. Les modèles murins classiques pour l'étude de l'athérosclérose sont les souris déficientes pour le récepteur aux LDL (Ldlr<sup>-/-</sup>) et l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>).

Le récepteur aux LDL lie les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, Intermediate Density Lipoprotein) et faible densité (LDL, Low Density Lipoprotein) et participe à l'homéostasie du cholestérol [456].

L'absence du gène codant pour le récepteur aux LDL est à l'origine de l'hypercholestérolémie familiale chez l'Homme [457], d'hypercholestérolémie chez le lapin Watanabe-heritable hyperlipidemic [458] et le singe rhésus [459]. Chez l'humain et le lapin déficients pour ce gène, les taux de cholestérol LDL et IDL sont extrêmement élevés et conduisent au développement précoce de lésions athéromateuses.

Les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> ont un taux de cholestérol plasmatique augmenté sous régime standard (5 mmol/L contre 2 mmol/L pour souris sauvages) [460]. En revanche, sous régime enrichi en cholestérol, elles développent une cholestérolémie supérieure à 25mmol/L [461] et développent rapidement des lésions athéromateuses [462]. Leur profil lipoprotéique est comparable à l'Homme, malgré l'absence de la protéine de transfert des esters de cholestérol, avec une augmentation des fractions IDL/LDL. L'effet sur les VLDL varie en fonction du régime, alors que la fraction HDL n'est pas affectée. Les études cinétiques ont montré que la capture et l'élimination de VLDL et LDL marquées étaient retardées par rapport aux souris sauvages.

L'apolipoprotéine E est synthétisée par le foie et les macrophages. Elle est intégrée au sein des différentes classes de lipoprotéines [463] et lie : le récepteur aux LDL et le récepteur apparenté LRP (LDL-receptor Related Protein) au niveau du foie, permettant ainsi la capture des lipoprotéines athérogènes (LDL, IDL et VLDL), le récepteur aux VLDL au niveau du muscle et du tissu adipeux qui capte les VLDL et les chylomicrons, le récepteur ER-2 au niveau du cerveau et du placenta qui capte les VLDL et les chylomicrons remnants et la mégaline au niveau des reins, de l'intestin et du placenta qui capte les LDL, VLDL mais aussi les HDL.

Par conséquent, la délétion de ce gène entraîne un défaut d'élimination hépatique des LDL et VLDL et une hypercholestérolémie associée au développement spontané de lésions athéromateuses sous régime standard. Le type de lésions est comparable à l'Homme et débutent par des stries lipidiques et sont accélérées par l'administration d'un régime enrichi en lipides [464]. Ce modèle présente des taux plasmatiques de cholestérol élevés sous régime standard (multiplié par 4 par rapport aux souris sauvages) et ces taux peuvent atteindre jusqu'à 70 mmol/L sous régime gras [465]. Par ailleurs, le cholestérol est essentiellement transporté par les VLDL contrairement à l'Homme dont le cholestérol est véhiculé par les LDL.

## III. Article 2

1

**Pharmacological activation of the constitutive androstane receptor (CAR) decreases plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice**

**Short title: Masson D, CAR activation decreases atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> mice.**

Anne-Laure Sberna<sup>1</sup>, Mahfoud Assem<sup>2</sup>, Thomas Gautier<sup>1</sup>, Boris Guiu<sup>3</sup>, Valérie Deckert<sup>1</sup>, Angélique Chevriaux<sup>1</sup>, Jacques Grober<sup>1</sup>, Naig Le Guern<sup>1</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>1</sup>, Laurent Lagrost<sup>1,4</sup> and David Masson<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> INSERM U866, Faculté de Médecine and Institut Fédératif de Recherche Santé-STIC  
BP87900, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>2</sup> Pharmaceutics and Translational Therapeutics, College of Pharmacy, University of Iowa,  
Iowa City, Iowa 52242, USA

<sup>3</sup> Department of Radiology, Dijon University Hospital, 21079 Dijon Cedex, France.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed: David MASSON or Laurent LAGROST,  
Faculté de Médecine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon Cedex France. Tel : 33 3 80 39  
32 63; Fax 33 3 80 39 34 47; email: [david.masson@chu-dijon.fr](mailto:david.masson@chu-dijon.fr) or [laurent.lagrost@u-bourgogne.fr](mailto:laurent.lagrost@u-bourgogne.fr)

**Word count : 5,916**

**Subject codes :** [90], [143], [145]



**Abstract:**

**Rationale:** The nuclear receptor CAR (constitutive androstane receptor) is involved in xenobiotic and bile acid metabolism but its implication in cholesterol metabolism and atherosclerosis is yet unclear.

**Objectives:** To determine to which extent CAR affects lipoprotein metabolism in hyperlipidemic mice and whether it is a target in the prevention of atherosclerosis.

**Methods and results:** LDL receptor-deficient (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) and Apo E-deficient (*ApoE*<sup>-/-</sup>) mice fed with a western-type diet were treated weekly by either the CAR agonist 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) or the vehicle only. In *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, TCPOBOP treatment induced a decrease in plasma triglyceride (TG) levels and IDL/LDL cholesterol levels (~30 % decrease in both cases after two months,  $p < 0.01$ ). Accordingly, a significant reduction of the secretion of triglycerides was observed in TCPOBOP treated mice in link with a decreased hepatic TG content and a repression of genes involved in lipogenesis such as *Srebp1c* and *Scd1*. Noticeably, a marked increase in the very low density lipoprotein receptor (Vldlr) in the CAR agonist-treated group was observed and likely contributed to the decrease in IDL/LDL levels. Accordingly, atherosclerotic lesions in aortic valves were reduced in TCPOBOP-treated *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice (-60 %,  $P < 0.001$ ). In *ApoE*<sup>-/-</sup> mice, which lack the physiological apoE ligand for the Vldlr, the effect of TCPOBOP on plasma cholesterol levels was markedly attenuated (only 10% decrease after one week) and most importantly, a significant decrease of atherosclerotic lesions in aortic valves no longer occurred.

**Conclusion:** CAR arises as a new target in the prevention and treatment of hypercholesterolemia and atherosclerosis.

**Key words:** CAR (constitutive androstane receptor)-TCPOBOP-Atherosclerosis-Cholesterol

**Non-standard Abbreviations and Acronyms**

**TCPOBOP** : 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

**Car**: Constitutive androstane receptor

**Vldlr** : Very low density lipoprotein receptor

**Ldlr<sup>-/-</sup> mice** : Low density lipoprotein deficient mice

**ApoE<sup>-/-</sup> mice**: Apolipoprotein E deficient mice

**VLDL** :Very low density lipoproteins

**IDL** : Intermediate density lipoproteins

**LDL**: Low density lipoproteins

**HDL**: High density lipoproteins

**TG**: Triglycerides

**ApoB**: Apolipoprotein B

**FPLC**: Fast protein liquid chromatography

## Introduction

Constitutive androstane receptor (CAR) is a nuclear receptor that is primarily considered as a xenobiotic sensor<sup>1,2</sup>. Indeed, numbers of its target genes are involved in the hydroxylation, conjugation and excretion of potentially harmful exogenous molecules. In addition to these well-recognized functions, CAR plays a role in the metabolism of endogenous compounds such as bile acids. Indeed, under cholestatic conditions, CAR promotes the detoxification of bile acids through alternative pathways that are distinct from those regulated by the classical bile acid receptor Farnesoid X receptor (FXR)<sup>3-5</sup>. Beside bile acids, the implication of CAR in other lipid metabolic pathways has been recently recognized, but with somewhat contradictory reports regarding its implication in cholesterol and triglyceride metabolism. On the one hand, several studies have demonstrated that CAR activation reduces plasma TG levels and liver steatosis in mice through inhibition of hepatic lipogenesis<sup>6-9</sup>. On the other hand, it has been reported that the rise in plasma TG levels observed in ob/ob mice fed a high fat diet is abolished in *Car*-deficient animals<sup>10</sup>. Accordingly, TCPOBOP, a specific CAR activator, was found to increase plasma TG in the same study<sup>10</sup>. These effects were explained by a CAR-mediated inhibition of PPAR $\alpha$ -dependent oxidation of fatty acids, which might well have overcome the concomitant inhibition of lipogenesis in the liver<sup>10</sup>. Beside triglyceride metabolism, we have recently shown that short-term/5-day treatment of WT and HuAITg mice with TCPOBOP is able to markedly reduce HDL cholesterol levels. Reciprocally, *Car*-deficient mice displayed higher HDL cholesterol levels under high fat diet<sup>11</sup>. Interestingly, and in addition to its impact on the HDL bulk in WT mice, TCPOBOP was also found to induce a significant decrease in plasma apoB-containing lipoproteins, with significant reductions in plasma apoB and LDL cholesterol levels<sup>11</sup>. Since, unlike in humans, HDL predominate in plasma of both WT and HuAITg mice, the observed decreases in LDL levels did not contribute to a large extent to the TCPOBOP-mediated decrease in total plasma cholesterol levels in these mice, and the impact on apoB-containing lipoproteins might well have been underestimated. In all cases, observed lipoprotein changes were found to be CAR-specific with no changes in either HDL or apoB-containing lipoproteins in TCPOBOP-treated mice with homozygous CAR deficiency.

The aim of the present study was to explore the effect of CAR activation on lipoprotein metabolism and atherogenesis on the long term, with specific emphasis on apoB-containing lipoproteins in a mouse model with a human-like lipoprotein profile (*i.e.* in which plasma cholesterol is predominantly localized in LDL, not in HDL). To this end, *Ldlr*-deficient (*Ldlr*<sup>-/-</sup> mice) and ApoE-deficient (*ApoE*<sup>-/-</sup> mice) mouse homozygotes were fed a western-type diet and they were treated or not by weekly administration of the CAR agonist TCPOBOP. Plasma lipoprotein profiles were determined at 5-day, 4-week and 8-week time points, and the development of atherosclerosis lesions was assessed at the completion of the 8-week period. It is shown here that the CAR agonist TCPOBOP decreases plasma TG-rich lipoprotein and IDL/LDL levels, resulting in a significant reduction in the atherosclerotic lesion areas in TCPOBOP-treated *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. In contrast, TCPOBOP had a minimal impact on plasma cholesterol levels and did not reduce atherosclerotic lesions to a significant extent in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice.

**Material and Methods :**

**A detailed material and methods section is available online.**

**Animals:** *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice on an homogenous C57Bl6 background (Jackson laboratory, Bar Harbor, ME) were used in the present study. TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was given at the dose of 3 mg/kg to the mice during two months with a weekly intraperitoneal injection with corn oil as vehicle. Control animals received the vehicle only. Animals were placed on a western-type diet (21% fat and 0.2% cholesterol, Safe, Augy, France). Weight gain and food intake were monitored on a weekly basis. Animals were sacrificed 5 days after the last injection. All experimental procedures were in accordance with the local guidelines for animal experimentation.

**Quantification of atherosclerosis lesions:** Heart and proximal aorta were perfused and fixed with paraformaldehyde and excised. Tissues were serially cryosectioned and stained with Oil-Red-O. The extent of Oil-Red-O staining was measured using color thresholding to delimit the area of staining with Photoshop software and the surface area stained with Oil-Red-O was determined. Aortic valve lesion size of each animal was calculated as the mean of lesion areas in 5 sections. Blind analysis was performed by two independent investigators. For immunohistological analysis, serial sections from proximal aorta were stained with oil-red-O, Masson-trichrome or immunostained with specific antibodies (Anti-alpha-smooth muscle actin (Sigma-aldrich) and Lamp-2 antibody (Dako ) for macrophages).

**Statistical analysis:** Results were expressed as mean  $\pm$  SD. All statistical data analysis was performed by Student's test except for atherosclerosis lesion areas which were analysed by a Mann-Witney U test.

## Results :

**Effect of TCPOBOP on lipoprotein profile in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** In order to assess the effect of CAR activation on plasma lipoprotein profile with specific emphasis on apoB-containing lipoproteins, *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice were treated up to 8 weeks with TCPOBOP. The CAR agonist was given weekly by intraperitoneal injection at a dose of 3 mg/kg. Plasma samples were collected after 5 days, 4 weeks and 8 weeks of treatment. TCPOBOP administration was well tolerated all along the 8-week period studied, with no significant changes in food intake and with only moderate elevation of hepatic transaminase levels (Table SI). As previously described<sup>12</sup>, TCPOBOP-treated mice gained slightly less weight (figure S1). TCPOBOP treatment dramatically induced the expression of the *Sult2a1* prototypical CAR target gene<sup>13</sup>, thus indicating efficient CAR stimulation. As shown in Table 1 and figure 1A, CAR activation induced a marked decrease in total plasma cholesterol concentration at day 5, with significant reductions in the cholesterol content of all lipoprotein subclasses, including VLDL, LDL and HDL. Plasma triglyceride concentration was also significantly reduced (Table I) due to a decrease of the VLDL fraction (figure 1B). Overall, a consistent picture was maintained all along the 8-week period studied, however with few differences in the effect of TCPOBOP after long-term/8-week than after short-term/5-day treatment. A 30% reduction of IDL/LDL cholesterol was still observed in TCPOBOP-treated mice after 8 weeks, whereas HDL and VLDL cholesterol levels did no longer differ from those of untreated animals (Figure 1C and 1D). The reduction of plasma triglycerides was also maintained up to 8 weeks of treatment (Figure 1D). Accordingly, plasma level of apolipoprotein B was significantly reduced in the TCPOBOP-treated group (Figure 1E).

### **Effect of TCPOBOP on hepatic lipid content, VLDL production and lipogenic pathways.**

In order to determine whether alteration in VLDL production by the liver might contribute to the reduction of plasma TG concentration, the accumulation of liver-derived VLDL particles in plasma was measured in fasted *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice which were injected with poloxamer P407 (i.e. a VLDL catabolism blocker). As shown in Figure 2A, intraperitoneal injection of poloxamer induced a time-dependent accumulation of triglycerides, as well as of VLDL cholesterol in the blood of both control and TCPOBOP-treated mice. Whereas triglyceride secretion was substantially reduced in TCPOBOP-treated mice as compared to untreated controls, no difference in VLDL cholesterol secretion was observed (Figure 2B). Accordingly, analysis of VLDL composition in TCPOBOP-treated mice after 8 weeks of treatment revealed that the particles were enriched in cholesterol as compared to TG (cholesterol to triglyceride ratio :  $6.68 \pm 2.67$  vs  $4.38 \pm 1.59$ ,  $P < 0.05$ ). Since lipid availability is a limiting step for secretion of apoB-containing lipoproteins by the liver, we measured the hepatic triglyceride and cholesterol content. As shown in Figure 2C, liver of TCPOBOP-treated mice showed a reduction in TG and cholesterol levels. Finally, we checked for mRNA levels of genes involved in the control of lipogenesis such as Insulin induced gene 1 (*Insig-1*), Sterol responsive element binding protein 1c (*Srebp1c*), Fatty acid synthase (*Fas*), Acetyl CoA carboxylase (*Acc*) and Steroyl CoA desaturase (*Scd-1*) (Figure 2E). As previously described, *Insig1*, which is a negative regulator of *Srebp1c* cleavage<sup>14</sup>, was induced by the TCPOBOP treatment, *Srebp1c* and *Scd-1* mRNA levels were decreased, whereas no changes were observed for *Acc* and *Fas* (Figure 2E). Interestingly and as previously reported, mRNA levels of Peroxisome-proliferator activated receptor alpha (*PPAR $\alpha$* ) target genes such as *Cpt1* (carnitin-palmitoyl transferase 1), *Cyp4a14*, and *Ct1* (Cytosolic Acyl-CoA thioesterase 1) were markedly reduced in TCPOBOP-treated mice (Figure 2D). The expression level of HMGCoA Reductase (*Hmgr*) (i.e. a well-known cholesterol-sensitive gene) was increased in

the liver of TCPOBOP-treated animals (Figure 2E), coming in further support of the decreased hepatic cholesterol content of TCPOBOP-treated mice.

Finally, in order to demonstrate further that changes in mRNA levels were a direct consequence of CAR activation and not restricted to *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice, WT and *Car*<sup>-/-</sup> mice were treated by TCPOBOP injection. As shown in Figure S2, the TCPOBOP-mediated changes were abolished in *Car*<sup>-/-</sup> mice for all the genes while the effect was maintained in WT mice with a repression of *Cpt1*, *Cte*, *Cyp4a14* and *Srebp1c* and induction of *Insig-1* (figure S2).

**CAR activation increases mRNA and protein levels of the VLDL receptor in the liver due to an activation of the *Vldlr* promoter.**

A reduction of IDL/LDL cholesterol levels in TCPOBOP-treated mice was constantly observed along the 8-week period studied. In order to establish whether it might relate to changes in lipoprotein clearance pathways, hepatic mRNA levels of major genes driving recognition and catabolism of apoB-containing lipoprotein were assessed by real time PCR. As shown in figure 3A, VLDL receptor (*Vldlr*) mRNA levels were induced by approx. 30 fold after TCPOBOP treatment, also leading to a rise in *Vldlr* protein levels as shown by western blot analysis (Figure 3B). In contrast, no changes were observed for LDL receptor related protein (*Lrp*), hepatic lipase (*Hl*), lipoprotein lipase (*Lpl*) or scavenger receptor B1 (*Sr-BI*) mRNA levels (Figure 3C). Again, and in order to demonstrate further that *Vldlr* overexpression was a direct consequence of CAR activation, WT and *Car*<sup>-/-</sup> mice<sup>15</sup> were treated by TCPOBOP injection. As shown in Figure 3D, the TCPOBOP-mediated induction of *Vldlr* was completely abolished in *Car*<sup>-/-</sup> mice.

Interestingly since the *Vldlr* is known to bind apoE but not apoB<sup>16</sup> we checked the distribution of these two apolipoproteins in FPLC fractions (figure S3). We observed that apoE was present not only in VLDL but also in IDL/LDL fractions supporting the Car-mediated induction of the *Vldlr* as a contributor of the TCPOBOP-mediated decrease of these lipoprotein fractions.

To test whether CAR/RXR $\alpha$  heterodimers activate the mouse *Vldlr* promoter, we cloned different promoter fragment (-934, -676, -488 and -177 bp upstream of the transcription initiation site) into the pGL3 luciferase reporter vector. As shown in Figure 3E, the activity of the -934 and -676 promoters were significantly increased in cells transfected with CAR and RXR $\alpha$  expression vectors and treated with TCPOBOP. This induction was abolished with the -488 and -177 bp suggesting the presence of a CAR responsive element between -676 and -488.

Overall, these observations come in support of an effect of TCPOBOP in increasing the catabolic pathway for the apo B-containing lipoproteins through a Car-mediated up regulation of the VLDL receptor.

**TCPOBOP decreases atherosclerotic lesions in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.**

We sought for the consequences of TCPOBOP-mediated changes in plasma lipoprotein parameters on atherosclerosis susceptibility. After completion of the 8-week treatment period, the extent of atherosclerotic lesions was quantified on serial cryosections of the proximal aorta after Oil-Red-O staining. As shown in Figure 4A, the atherosclerotic lesion area in the proximal aorta was substantially reduced, by approximately 60 % in TCPOBOP-treated animals as compared to controls receiving the vehicle only. Immunohistological analysis of lesions revealed no major morphological differences between the two groups, in both cases with an accumulation of lipid rich macrophages (figure S4). Accordingly, CAR expression in the aortic wall was very low and no effect of TCPOBOP on gene expression in mouse macrophages could be observed in the present study (figure S5).

**CAR activation has a reduced impact on plasma cholesterol levels and does not decrease significantly the atherosclerotic lesions in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice.**

Since apoE unlike apoB is a ligand for the Vldlr<sup>16,17</sup>, we searched whether the impact of CAR activation on plasma cholesterol levels and atherosclerosis development was maintained in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. The mice were treated with TCPOBOP for 8 weeks using the same protocol. As for *Ldlr*<sup>-/-</sup>, TCPOBOP administration was well tolerated all along the 8-week period studied, with no significant changes in food intake and with a moderate elevation of hepatic transaminase levels (Table SI). Again, TCPOBOP-treated mice gained slightly less weight (figure S6). As expected, TCPOBOP treatment dramatically induced the expression of the *Sult2a1* prototypical CAR target gene<sup>13</sup>. We also compared the expression of Car target genes after only one TCPOBOP injection and after two months of treatment to check whether efficient Car activation was maintained all along the treatment. In all cases similar or even greater induction of the genes was observed in the TCPOBOP treated group after two months thus indicating efficient and persistent CAR stimulation (figure S7). As shown in Table II and figure 5A, CAR activation induced only a moderate decrease in total plasma cholesterol concentration at day 5 (-10%  $P < 0.05$ ) with a reduction of the cholesterol content of the VLDL fraction (figure 5A). Plasma triglyceride concentrations were also significantly reduced (Table 2) due to a decrease of the VLDL fraction (figure 5A). However, no significant changes in plasma cholesterol and triglyceride levels were observed after 4 and 8 weeks and the proportion of VLDL and IDL/LDL fractions did not change at 8 weeks (figure 5A). Finally, after completion of the 8-week treatment period, the extent of atherosclerotic lesions was quantified on serial cryosections of the proximal aorta after Oil-Red-O staining. As shown in Figure 6A, only a non significant tendency toward the reduction in the atherosclerotic lesion of the proximal aorta was observed in TCPOBOP-treated animals as compared to controls receiving the vehicle only.

**Discussion**

It has been previously observed in our laboratory that TCPOBOP is able to decrease both HDL and LDL cholesterol in mice. However, these effects were monitored over short periods of treatment in wild-type (WT) mice that, unlike humans, normally present only moderate levels of apoB-containing lipoproteins. Results of the present study demonstrate that treatment with the CAR agonist TCPOBOP has the potential to decrease the circulating levels of apoB-containing lipoproteins and to reduce the development of atherosclerotic lesions on the long term in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. The beneficial effects on the lipoprotein profile are related, at least in part, to a decreased secretion of TG-rich lipoproteins and to an increased clearance of cholesterol-rich/apoB-containing lipoproteins, while the early effect on HDL level is only transient. The CAR-mediated induction of the Vldlr is likely to account at least in part, for the observed phenotype since the effect of TCPOBOP are markedly attenuated in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice that lack this physiological ligand for the Vldlr, in particular with no significant effect on atherosclerosis lesion area of the proximal aorta.

CAR was initially described as a xenobiotic sensor that regulates genes involved in the detoxification and elimination of potentially harmful exogenous molecules. However, recent studies have underlined its role in the metabolism of endogenous molecules including bile acids, cholesterol and triglycerides. As observed in a recent study from our group<sup>11</sup>, treatment of WT, C57Bl6 mice by a CAR agonist decreased HDL cholesterol and apoA-I, and also reduced LDL cholesterol levels. However, these observations were made after only a short

period of treatment with the CAR agonist and in a model that, unlike humans, naturally displays very low levels of apoB-containing lipoproteins. We chose here to use *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice fed a western type diet to assess the effects of CAR activation on both lipoprotein metabolism and atherosclerotic lesions over a longer/2-month period. *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice display high levels of apoB-containing lipoproteins and are highly susceptible to diet-induced atherosclerosis. As previously described, five-day treatment with the CAR agonist produced a marked reduction in total plasma cholesterol levels that was related to a decrease in all lipoprotein classes, including VLDL, LDL, and HDL. A reduction of plasma TG levels was also observed. A consistent, but slightly different picture was observed after longer periods of treatment. Whereas VLDL and HDL cholesterol levels were no longer reduced, a ~30 % reductions of LDL cholesterol and plasma TG levels were still observed at week 4 and 8. These results clearly show that CAR activation can exert two kinds of effects. On the one hand, acute effects on HDL and VLDL are only transient and disappear after a few weeks of treatment, suggesting the existence of compensatory mechanisms that antagonize CAR activity. On the other hand, reductions in LDL cholesterol and triglyceride levels are observed at any time point and might be mediated by distinct, CAR-specific mechanisms.

There is an apparent controversy about the effect of CAR on triglyceride metabolism. On the one hand CAR activation has been shown to reduce plasma TG levels, to decrease VLDL secretion and to reduce lipogenesis in mice<sup>7-9</sup>. These effects were further associated as in the present study with the CAR-mediated induction of the *Insig1* gene that negatively regulates the lipogenic transcription factor *Srebp1c*<sup>6,7</sup>. On the other hand, TCPOBOP treatment has been shown to increase TG levels in WT mice fed a western type diet<sup>10,11</sup> and *Car*-deficient mice present significantly lower plasma TG levels under a high fat diet<sup>10</sup>. Moreover, CAR deficiency has been shown to increase fatty acid beta oxidation, suggesting that CAR antagonized some PPAR- $\alpha$  mediated pathways (including beta oxidation). We provide here a tentative explanation to this apparent controversy. In accordance with earlier observations<sup>10</sup>, the CAR-mediated inhibition of PPAR $\alpha$ -dependent pathways was supported by the decreased expression of PPAR $\alpha$  target genes such as *Cpt1*, *Cyp4a14* and *Ct1*. In contrast, and as previously described<sup>6,7</sup>, the *Insig-1* gene (i.e. a negative regulator of *Srebp1c* cleavage) was induced after CAR activation and mRNA levels of key lipogenic genes such as *Srebp1c* and *Scd-1* were down-regulated. Thus, CAR is able to exert concomitant and antagonistic actions and the overall effect is likely to result from a subtle balance depending on the metabolic context. As far as the present study is concerned, CAR activation clearly decreased liver TG content and plasma TG concentration, i.e. two potential beneficial effects in term of atherosclerosis. Moreover, since the effect of CAR activation on plasma TG levels was more pronounced in *Ldlr*<sup>-/-</sup> than in *ApoE*<sup>-/-</sup> we cannot exclude that induction of the *Vldlr* also contributed to the decrease of plasma TG levels.

Beside plasma TG levels, the atherogenicity of lipoprotein profile in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice is mainly determined by the accumulation of cholesterol-rich, IDL/LDL lipoproteins due to the absence of LDL-receptor expression. Importantly, we show here that TCPOBOP is able to increase the catabolism of these lipoproteins likely through induction of hepatic VLDL-receptor which belongs to the LDL-R receptor family. Although VLDLR is a peripheral receptor which is normally expressed in muscle and adipose tissue with very low level of expression in the liver, its hepatic expression is known to increase in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Its expression is detectable at the mRNA and protein levels in the mouse liver and is submitted to transcriptional regulation<sup>18-20</sup>. This suggests its potential role as a back up for the LDL-receptor<sup>18</sup>. Our results show that TCPOBOP is able to increase further the VLDLr expression, by more than 30 fold in the liver after 8 weeks of treatment. Up-regulation of the *Vldlr* is the most relevant candidate in accounting for the increased clearance of apoB-containing lipoproteins in TCPOBOP-treated animals since we did not observe any changes for any other major apoB-lipoprotein receptor.



In further and strong support of the latter view, data from the literature clearly show that hepatic overexpression of Vldlr by the use of viral vectors promotes the preferential reduction of IDL/LDL particles, just as we observed in the present study<sup>19, 21-24</sup>. Most importantly, when the expression of the Vldlr ligand (*i.e.* apoE) was suppressed in *apoE*<sup>-/-</sup> mice, the impact of TCPOBOP treatment on plasma apoB-containing lipoproteins was markedly attenuated. Importantly, the TCPOBOP-mediated regulation is CAR specific since the effect on Vldlr expression was totally abolished in *Car*-deficient mice (Figure 4) and *Car* seems to act by increasing the activity of the Vldlr promoter (Figure 4).

Finally, in accordance with the potentially beneficial changes, atherosclerosis was significantly decreased in TCPOBOP-treated animals. The mechanisms that account for this reduction are likely related to the modification of plasma lipoprotein metabolism at the systemic level. Local effects at the vascular wall are unlikely because CAR is mainly expressed in the liver and in the intestine with much lower levels of expression in other tissues as this was confirmed in the present study<sup>15</sup>. While the decrease in plasma TG levels could have also contributed to the reduction of lesion size, reduction of cholesterol in apoB-containing lipoproteins likely produced the major impact in preventing atherosclerosis. Accordingly, hepatic expression of Vldlr by different strategies efficiently reversed hypercholesterolemia and atherosclerosis susceptibility in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice<sup>19, 22-24</sup> and no significant effect of TCPOBOP on atherosclerotic lesion area in the proximal aorta in *apoE*<sup>-/-</sup> mice was observed in the present study.

Despite reported induction of liver hyperplasia and carcinoma in mice after extended treatment with CAR agonists<sup>25</sup>, up to 8 week treatment by TCPOBOP was well tolerated in the present study and did not produce apparent deterioration of the health status of the animals. It should be emphasized that mice and humans are known to differ markedly in their susceptibility to non-genotoxic carcinogens<sup>26</sup>. Indeed drugs presenting some CAR activating properties are currently used in human therapy<sup>27</sup> and PPAR- $\alpha$  agonists, who also induced liver hypertrophy and tumorigenesis in mice, are widely used in human therapeutic in the treatment of dyslipidemia<sup>27, 28</sup>. Whether CAR constitutes a promising target in the prevention and/or treatment of atherosclerosis in humans will deserves specific attention.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from the Université de Bourgogne, the Conseil Regional de Bourgogne, INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), the ANR (Agence Nationale de la Recherche), and the Fondation de France.

We thank Philippe Bastable for manuscript editing.

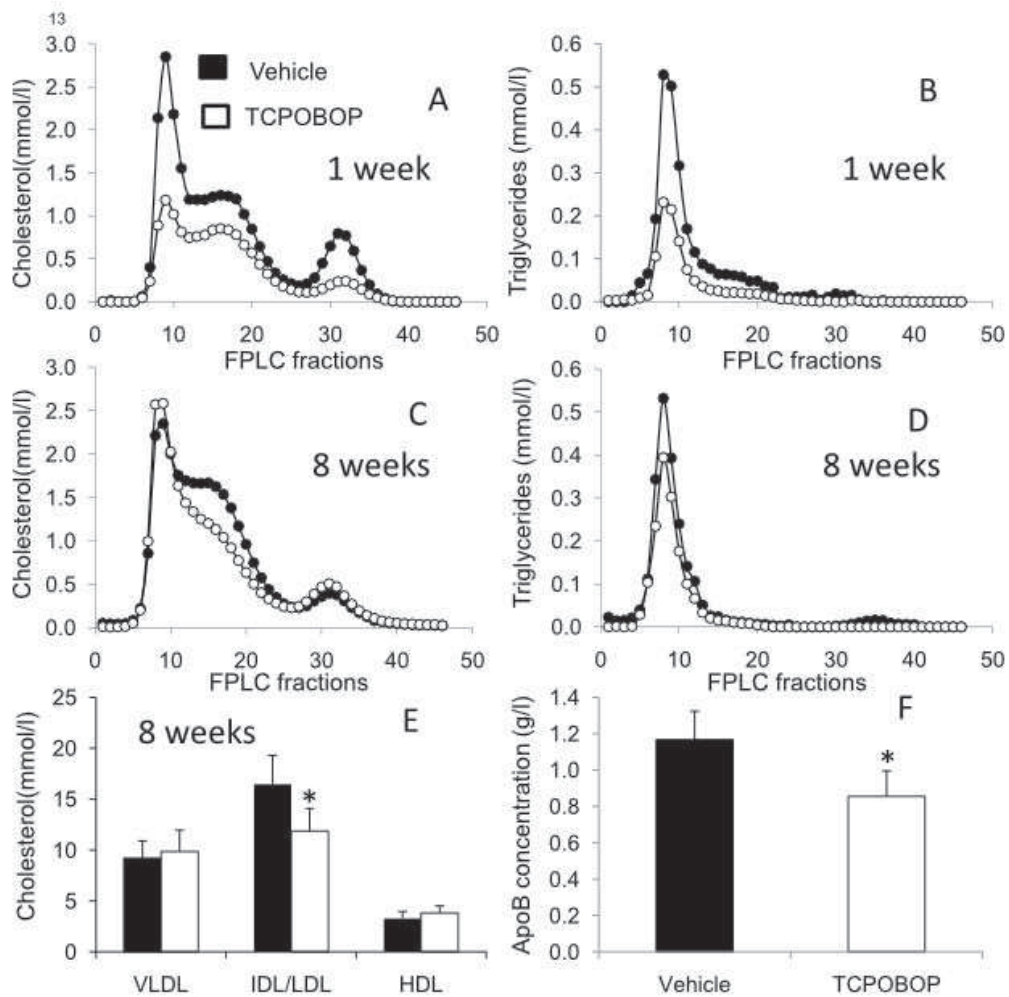
**Disclosures:**

None.

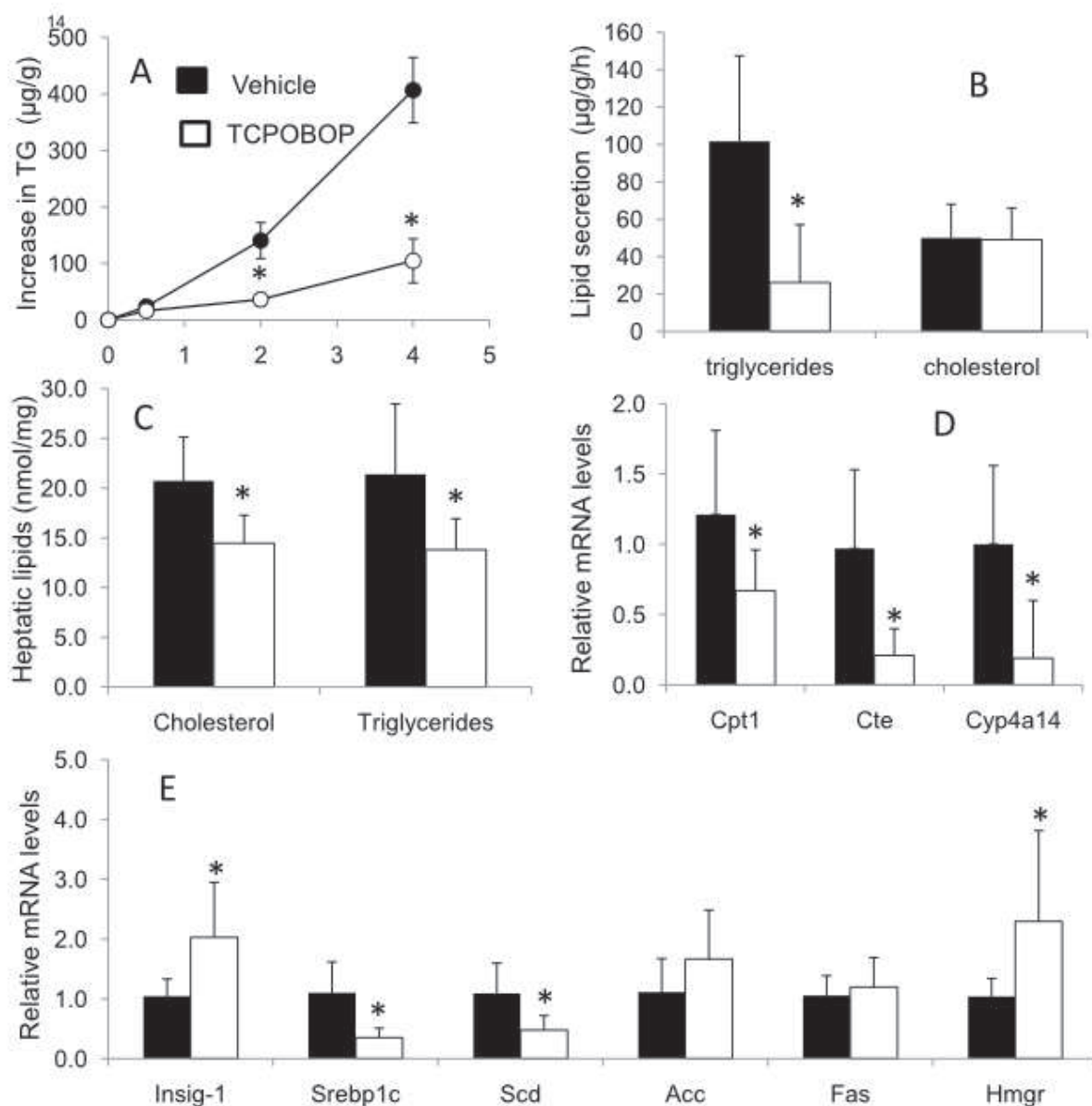
**References:**

1. Qatanani M, Moore DD. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Curr Drug Metab.* 2005;6:329-339.
2. Kretschmer XC, Baldwin WS. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact.* 2005;155:111-128.
3. Stedman CA, Liddle C, Coulter SA, Sonoda J, Alvarez JG, Moore DD, Evans RM, Downes M. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2063-2068.
4. Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology.* 2005;42:420-430.
5. Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB, Jr., Kliewer SA, Gonzalez FJ, Sinal CJ. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem.* 2003;278:45062-45071.
6. Roth A, Looser R, Kaufmann M, Blattler SM, Rencurel F, Huang W, Moore DD, Meyer UA. Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression. *Mol Pharmacol.* 2008;73:1282-1289.
7. Baskin-Bey ES, Anan A, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP, attenuates steatohepatitis in the methionine choline-deficient diet-fed mouse. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5635-5641.
8. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2009;284:25984-25992.
9. Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, Stevens RD, Ilkayeva O, Newgard CB, Chan L, Moore DD. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:18831-18836.
10. Maglich JM, Lobe DC, Moore JT. The nuclear receptor CAR (NR1H3) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. *J Lipid Res.* 2008.
11. Masson D, Qatanani M, Sberna AL, Xiao R, Pais de Barros JP, Grober J, Deckert V, Athias A, Gambert P, Lagrost L, Moore DD, Assem M. Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *J Lipid Res.* 2008;49:1682-1691.
12. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. CAR is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2009.
13. Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, Zelcer N, Adachi M, Strom S, Evans RM, Moore DD, Borst P, Schuetz JD. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem.* 2004;279:22250-22257.
14. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 2002;110:489-500.

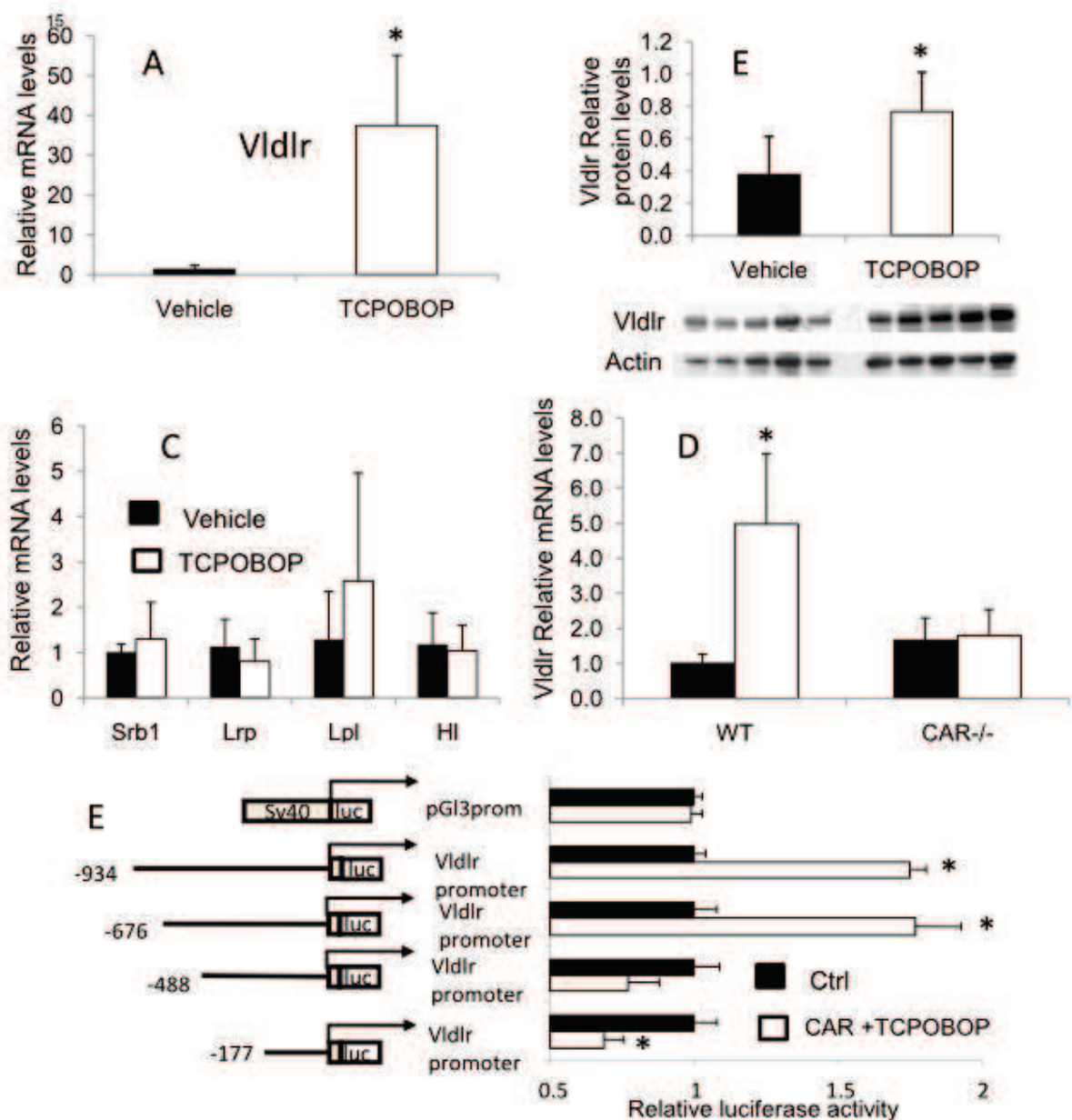
15. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*. 2000;407:920-923.
16. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT. The very low density lipoprotein (VLDL) receptor--a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Mol Cell Biochem*. 2003;248:121-127.
17. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:141-172.
18. Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, Gresti J, Du ZY, Chardigny JM, Sebedio JL, Clouet P. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR-/- apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res*. 2006;47:2647-2655.
19. Chen SJ, Rader DJ, Tazelaar J, Kawashiri M, Gao G, Wilson JM. Prolonged correction of hyperlipidemia in mice with familial hypercholesterolemia using an adeno-associated viral vector expressing very-low-density lipoprotein receptor. *Mol Ther*. 2000;2:256-261.
20. Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, Hum DW, Fruchart JC, Staels B. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett*. 2004;566:173-177.
21. Jong MC, van Dijk KW, Dahlmans VE, Van der Boom H, Kobayashi K, Oka K, Siest G, Chan L, Hofker MH, Havekes LM. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochem J*. 1999;338 ( Pt 2):281-287.
22. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF, 3rd, Wilson JM. Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet*. 1996;13:54-62.
23. Oka K, Pastore L, Kim IH, Merched A, Nomura S, Lee HJ, Merched-Sauvage M, Arden-Riley C, Lee B, Finegold M, Beaudet A, Chan L. Long-term stable correction of low-density lipoprotein receptor-deficient mice with a helper-dependent adenoviral vector expressing the very low-density lipoprotein receptor. *Circulation*. 2001;103:1274-1281.
24. MacDougall ED, Kramer F, Polinsky P, Barnhart S, Askari B, Johansson F, Varon R, Rosenfeld ME, Oka K, Chan L, Schwartz SM, Bornfeldt KE. Aggressive very low-density lipoprotein (VLDL) and LDL lowering by gene transfer of the VLDL receptor combined with a low-fat diet regimen induces regression and reduces macrophage content in advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. *Am J Pathol*. 2006;168:2064-2073.
25. Huang W, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G, Moore DD. Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol*. 2005;19:1646-1653.
26. Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology*. 2008;246:2-8.
27. Wang H, Faucette S, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M, LeCluyse E. Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J Biol Chem*. 2004;279:29295-29301.
28. Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med*. 2005;83:774-785.



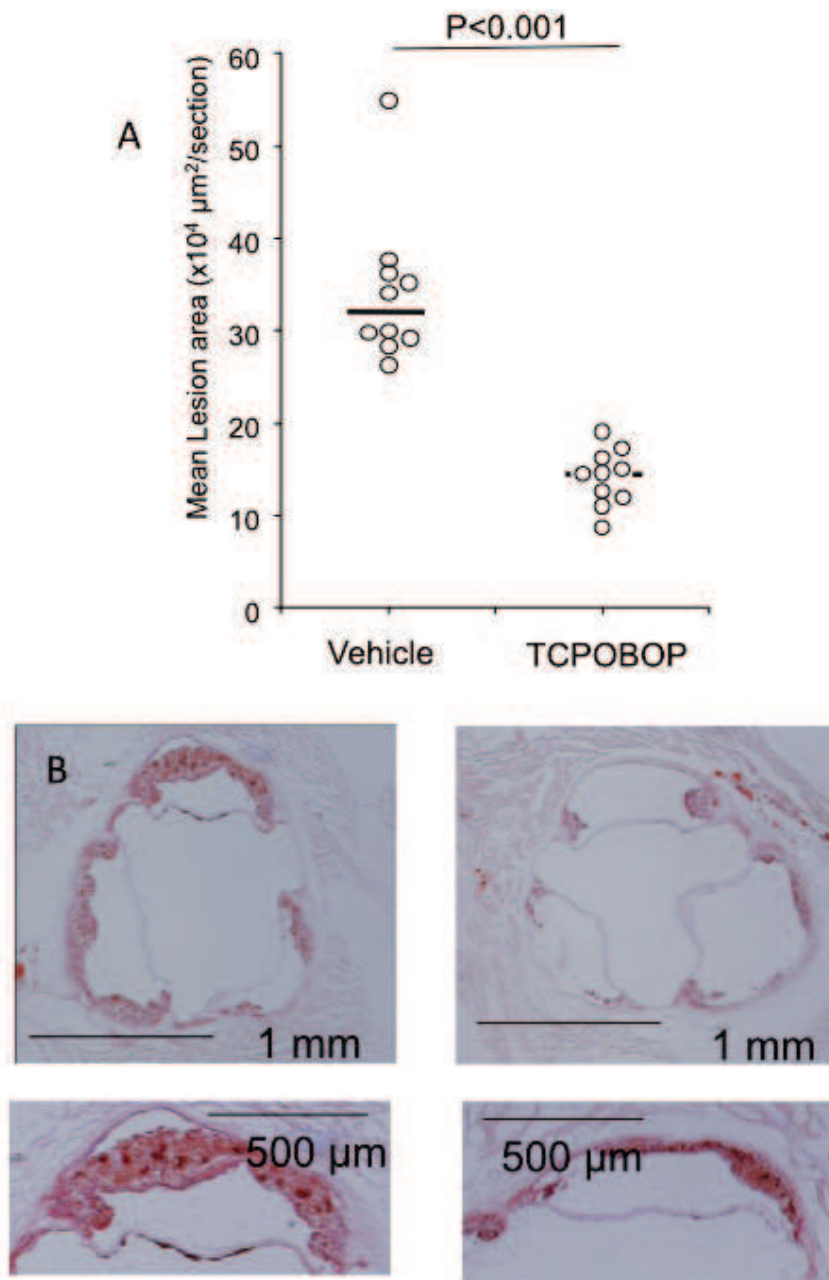
**Figure 1 (A-D) Plasma lipoprotein profiles of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Plasma from control and CAR agonist-treated animals were fractionated by FPLC. Three-hundred microliters of pooled plasma samples (day 5) or individual plasma samples (2 months) was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol or triglycerides content of individual fractions were determined. (A) cholesterol distribution after 5 days, (B) triglycerides distribution after 5 days, (C) cholesterol distribution after 2 months, (D) triglyceride distribution after 2 months. (E) Cholesterol concentration in lipoprotein subclasses after 2 months. Cholesterol concentration in lipoprotein subclasses were calculated from sum of fractions in individual FPLC profiles of mice. VLDL: fractions 4 to 10; IDL/LDL: fractions 11 to 24 and HDL: fractions 25 to 40. ( $n=10$  per group; \* $P<0.01$  vs vehicle). (F) ApoB concentration in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice after two months of treatment ( $n=8$ ; \* $P<0.05$ ).



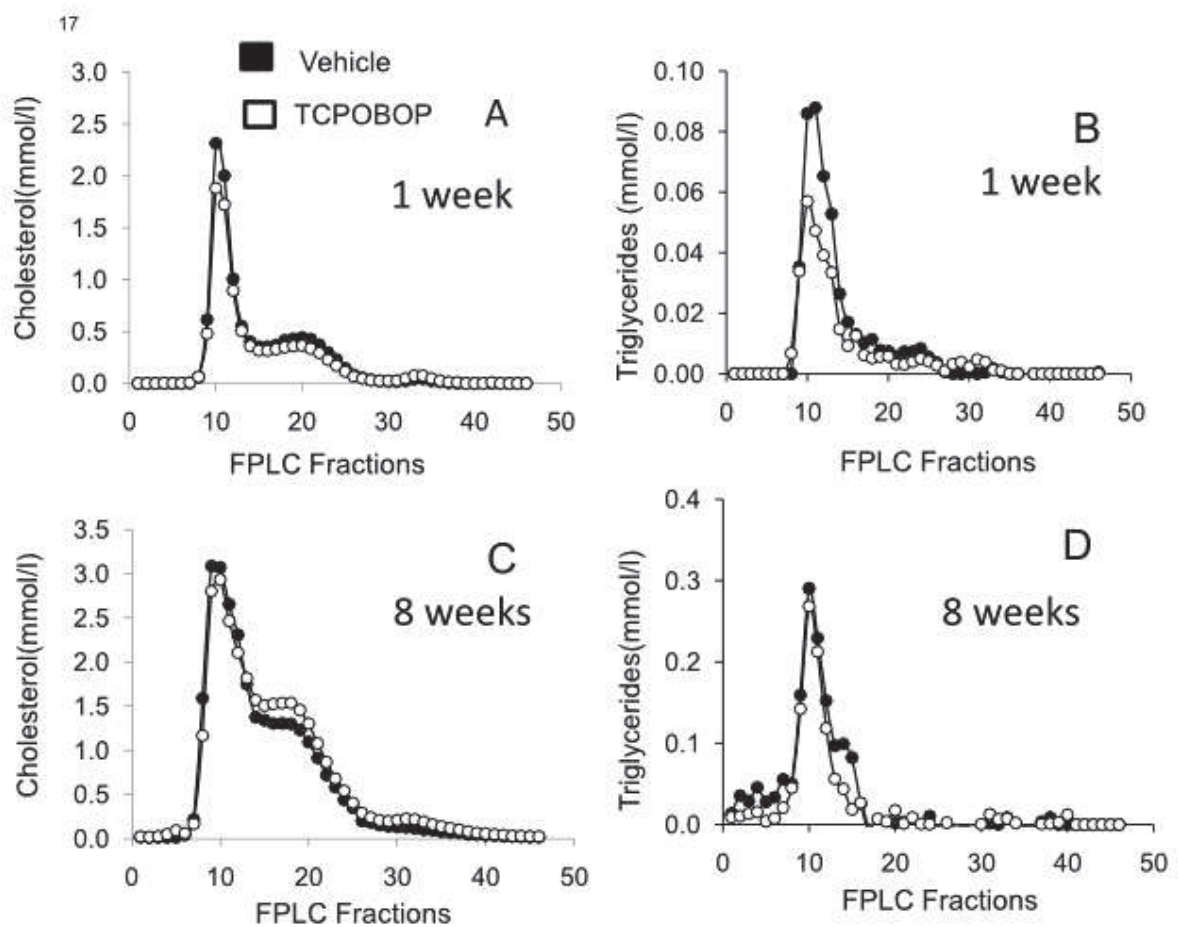
**Figure 2 (A) Triglyceride secretion in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP for 2 months.** Rates of production were assessed after Poloxamer injection. TG were measured by enzymatic methods before injection, after 30 minutes, 1 and 2 hours ( $n=10$ ; \* $P<0.005$  vs vehicle). **(B) Rate of triglyceride and cholesterol secretion in VLDL.** Cholesterol and triglycerides were measured in the VLDL fraction before injection and after 2 hours ( $n=10$ ; \* $P<0.01$  vs vehicle). **(C) Hepatic lipid content.** *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice were treated with TCPOBOP or vehicle for 2 months. Lipids were extracted from the liver and measured as described in Materials and Methods ( $n=10$ ; \* $P<0.01$  vs vehicle). **(D) Relative mRNA levels of PPAR- $\alpha$  target genes.** Liver mRNA levels of Cpt1, Cte and Cyp4A14 were determined by real-time RT-PCR ( $n=10$ ; \*\* $P<0.05$  vs vehicle). **(E) mRNA levels of genes involved in the control of lipogenesis and cholesterol synthesis.** Liver and mRNA levels of Insig-1, Srebp1c, Scd-1, Acc, Fas and Hmgr were determined by real-time RT-PCR ( $n=10$ ; \* $P<0.05$  vs vehicle).



**Figure 3. Analysis of hepatic receptors involved in apoB-lipoprotein catabolism in mice treated or not with the CAR agonist** (A) Relative Vldlr receptor mRNA levels in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice after two month of treatment ( $n=10$ ; \* $P<0.001$  vs vehicle). (B) Western blot analysis of Vldlr in the liver. Total proteins were extracted from the liver and Vldlr was detected with specific antibody and data were normalized with beta-actin (C) Relative mRNA levels of Lrp, Lpl, HI and Sr-BI were determined by real-time RT-PCR. (D) Relative mRNA levels of Vldlr in WT and *Car*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP ( $n=10$ ; \* $P<0.05$  vs vehicle). (E) Car activation increase Vldlr promoter activity. Human 293 HEK cells were transfected with Vldlr promoter constructs or the Sv40 promoter in pGL3 luciferase reporter vectors in the presence of pSG5-RXR and pCMx-CAR or empty vectors. Cells were treated with TCPOBOP (1  $\mu$ M) or DMSO (Ctrl) for 24 hours and luciferase activities were measured on cell lysates. Results are relative to the levels in untreated cells. Each bar is the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. \*:  $P<0.05$  Vs Ctrl.

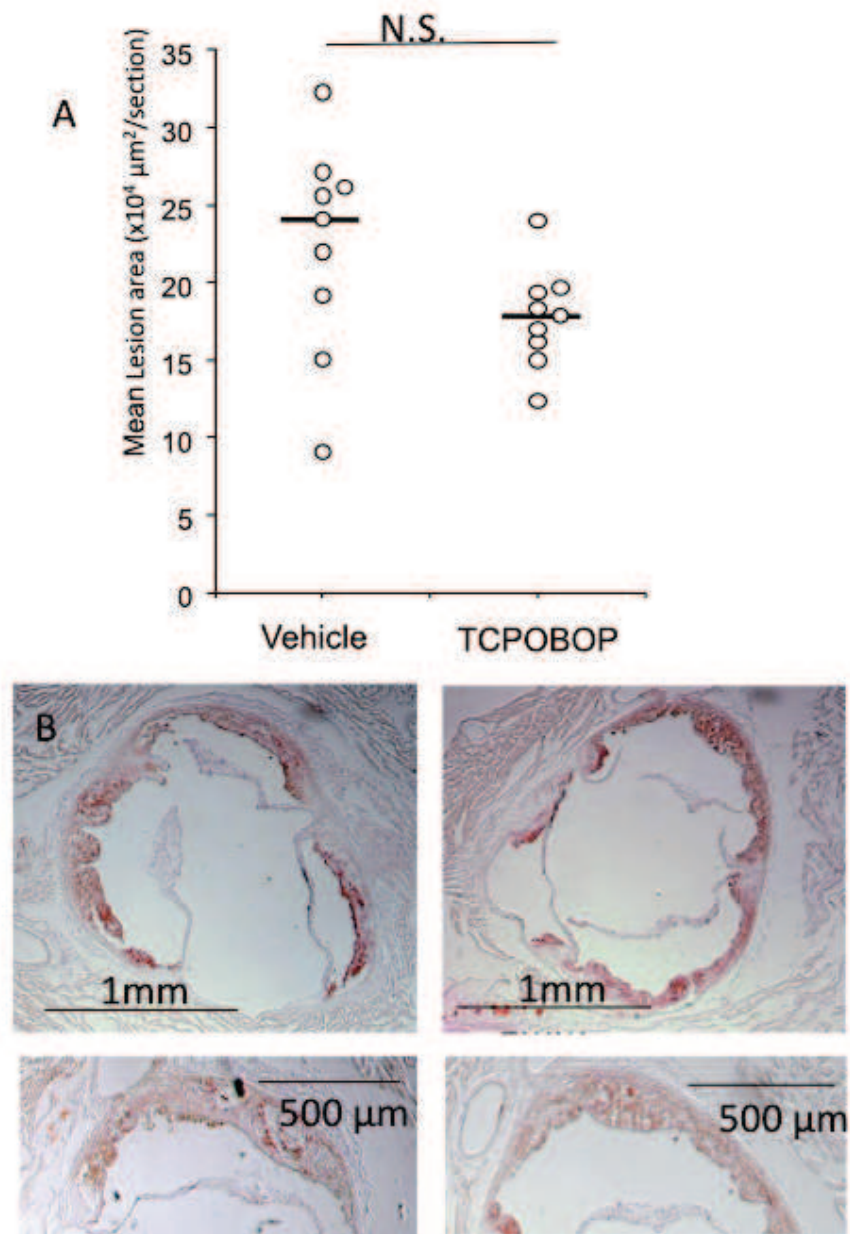


**Figure 4: Quantification of atherosclerotic lesions of *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP for 2 months. (A) Quantification of atherosclerotic lesion area in the aortic valves. Oil-Red-O stained area was quantified by color thresholding and are expressed as a  $\mu\text{m}^2$  ( $n=10$ ; \* $P<0.001$  vs vehicle). (B) Representative picture of Oil-Red-O stained aortic valves. Lesions in aortic roots were stained with Oil-Red-O to detect accumulation of lipids and photographed.**



**Figure 5 Plasma lipoprotein profiles of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** FPLC profiles after 5 days and two months of treatment. Plasma from control and CAR agonist-treated animals were fractionated by FPLC. Three-hundred microliters of pool from ten distinct mouse plasma samples was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol or triglycerides content of individual fractions was determined as described in Materials and Methods (A) cholesterol distribution after 5 days, (B) triglycerides distribution after 5 days, (C) cholesterol distribution after 2 months, (D) triglyceride distribution after 2 months.





**Figure 6: Quantification of atherosclerotic lesions of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP for 2 months. (A) Quantification of atherosclerotic lesion area in the aortic valves. Oil-Red-O stained area was quantified by color thresholding and are expressed as a μm<sup>2</sup> (*n*=9; N.S. vs vehicle). (B) Representative picture of Oil-Red-O stained aortic valves. Lesions in aortic roots were stained with Oil-Red-O to detect accumulation of lipids and photographed.**

**Table 1: Plasma lipids levels in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.** Animals were fed a western diet during 2 months and were treated either with vehicle or TCPOBOP (3 mg/kg/week). Blood from fasted mice was collected after 1, 4 and 8 weeks of the treatment. For HDL cholesterol determination, individual plasma samples were fractioned by ultracentrifugation at  $d=1.21$ . (Values are expressed in mmol/l and as mean  $\pm$  SD; \* $P<0.05$  vs vehicle).

	Control group (Vehicle) n=10	TCPOBOP treated group n=10
1 Week		
Total cholesterol	26.06 $\pm$ 2.27	14.00 $\pm$ 3.20*
HDL cholesterol	4.36 $\pm$ 0.35	1.55 $\pm$ 0.36*
Non-HDL cholesterol	21.63 $\pm$ 3.22	12.40 $\pm$ 2.80*
Triglycerides	2.65 $\pm$ 0.69	1.10 $\pm$ 0.59*
Phospholipids	8.92 $\pm$ 0.92	4.97 $\pm$ 0.86*
4 Weeks		
Total cholesterol	33.17 $\pm$ 3.68	25.89 $\pm$ 3.05*
HDL cholesterol	4.08 $\pm$ 0.45	4.79 $\pm$ 0.56
Non-HDL cholesterol	29.08 $\pm$ 3.22	21.1 $\pm$ 2.48*
phospholipids	9.11 $\pm$ 1.05	7.54 $\pm$ 0.97*
Triglycerides	2.28 $\pm$ 0.46	1.71 $\pm$ 0.20*
8 Weeks		
Total cholesterol	28.37 $\pm$ 4.55	25.47 $\pm$ 5.45
HDL cholesterol	3.27 $\pm$ 0.67	3.79 $\pm$ 0.69
Non-HDL cholesterol	25.43 $\pm$ 3.94	21.49 $\pm$ 4.07*
Triglycerides	2.20 $\pm$ 0.62	1.45 $\pm$ 0.81*
Phospholipids	7.16 $\pm$ 0.89	6.88 $\pm$ 1.0

**Table 2: Plasma lipids levels in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice.** Animals were fed a western diet during 2 months and were treated either with vehicle or TCPOBOP (3 mg/kg/week). Blood from fasted mice was collected after 1, 4 and 8 weeks of the treatment. For HDL cholesterol determination, individual plasma samples were fractionated by ultracentrifugation at  $d=1.21$ . (Values are expressed in mmol/l and as mean  $\pm$  SD; \* $P<0.05$  vs vehicle).

	Control group (Vehicle) n=9	TCPOBOP treated group n=9
		1 Week
Total cholesterol	11.16 $\pm$ 0.74	9.36 $\pm$ 0.52*
HDL cholesterol	2.91 $\pm$ 0.62	2.30 $\pm$ 0.65
Non-HDL cholesterol	8.26 $\pm$ 0.51	7.06 $\pm$ 1.06*
Triglycerides	0.46 $\pm$ 0.32	0.32 $\pm$ 0.05*
Phospholipids	2.00 $\pm$ 0.25	1.76 $\pm$ 0.18*
		4 Weeks
Total cholesterol	33.7 $\pm$ 7.39	31.3 $\pm$ 4.39
HDL cholesterol	1.56 $\pm$ 0.33	2.26 $\pm$ 0.32*
Non-HDL cholesterol	32.18 $\pm$ 7.15	29.08 $\pm$ 4.08
Phospholipids	5.34 $\pm$ 0.81	5.47 $\pm$ 0.63
Triglycerides	1.99 $\pm$ 0.74	1.50 $\pm$ 0.36
		8 Weeks
Total cholesterol	30.02 $\pm$ 9.95	30.6 $\pm$ 5.45
HDL cholesterol	0.92 $\pm$ 0.57	1.55 $\pm$ 0.34*
Non-HDL cholesterol	29.10 $\pm$ 9.51	29.19 $\pm$ 3.53
Triglycerides	1.25 $\pm$ 0.62	1.08 $\pm$ 0.81
Phospholipids	5.85 $\pm$ 2.04	5.98 $\pm$ 0.70

**Detailed methods :**

**Blood and tissue sampling:** Fasted animals were anaesthetized using xylazine/ketamine injection. Blood samples were collected by puncture in *veina cava* with heparinized syringes and were centrifuged at 8000 rpm for 10 min. Plasma were harvested and stored at -20°C. Livers were excised, weighted, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before mRNA extraction and biochemical analysis.

**Plasma lipid analysis:** All assays were performed on a Victor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Science; Boston, MA). Total cholesterol and triglyceride concentrations were measured by enzymatic methods using Cholesterol-FS (Diasys, Bouffémont, France) and Triglyceride-FS (Diasys) reagents, respectively. HDL and non-HDL fractions were separated by ultracentrifugation at a 1.07 density using a TLA-100 rotor on a TLX-120 ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and cholesterol concentrations were determined in each fraction. Plasma apoB concentrations were determined using a commercial ELISA kit (Uscn Life Science Inc. Wuhan, China) following the instructions provided by the manufacturer.

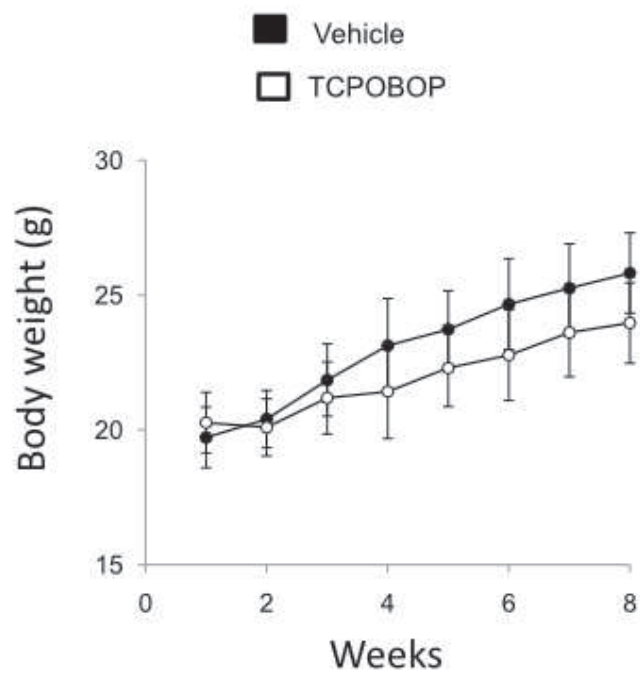
**Fractionation of plasma lipoproteins:** Plasma samples (300 µl) were injected on a Superose 6 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) connected to a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Amersham Biosciences, Saclay, France). Lipoproteins were eluted at a constant 0.3 ml/min flow rate with Tris-buffered saline containing 0.074% EDTA and 0.02% sodium azide. Total cholesterol and triglyceride concentrations were assayed in individual 0.3-ml fractions by enzymatic methods as described above. Apolipoprotein B and Apolipoprotein E were determined in individual fractions by Western blot analysis using apoB H-300 and apoE D-15 antibodies respectively (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)

**Triglyceride and cholesterol production rate in vivo:** Fasted mice were injected intraperitoneally with Poloxamer 407 (Lasersen, Etampes, France) (1 g/kg body weight). Blood samples were drawn into heparin-containing tubes at 0, 30, 120, and 240 min after injection, and plasma was prepared by centrifugation. Plasma triglyceride levels were determined as above, and the triglyceride production rate was calculated from the slope of the curve and expressed as µg/g body weight/h. For the determination of cholesterol accumulation in VLDL, the  $d < 1.007$  fraction was isolated by ultracentrifugation for 30 min. at 100 000 rpm and cholesterol concentration was determined in this fraction. Hepatic lipids were extracted and cholesterol and triglyceride levels were determined by enzymatic methods, as described previously<sup>1</sup>.

**Western blot analysis of VLDL receptor:** Liver samples frozen in liquid nitrogen were homogenized and suspended in a lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Soluble protein fractions were adjusted to a concentration of 1 µg/µl. 8 µg of proteins were separated by SDS-PAGE on NuPage 4-12% polyacrylamide gradient gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) under reducing conditions and finally transferred to PVDF membrane as described by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). The transfer membrane was blocked for 1h30 with TBS/tween containing 5% BSA, washed and incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibody for the Vldlr (1:1000) (VLDLR 6A6 Santa Cruz, Heidelberg, Germany) in TBS/tween containing 1% BSA. After extensive washing, the antigene-antibody complexes were detected using HRP (Horse radish peroxidase) labeled polyclonal goat anti-mouse IgG (1:2000) using a chemiluminescence kit detection system (Santa Cruz, Heidelberg, Germany).

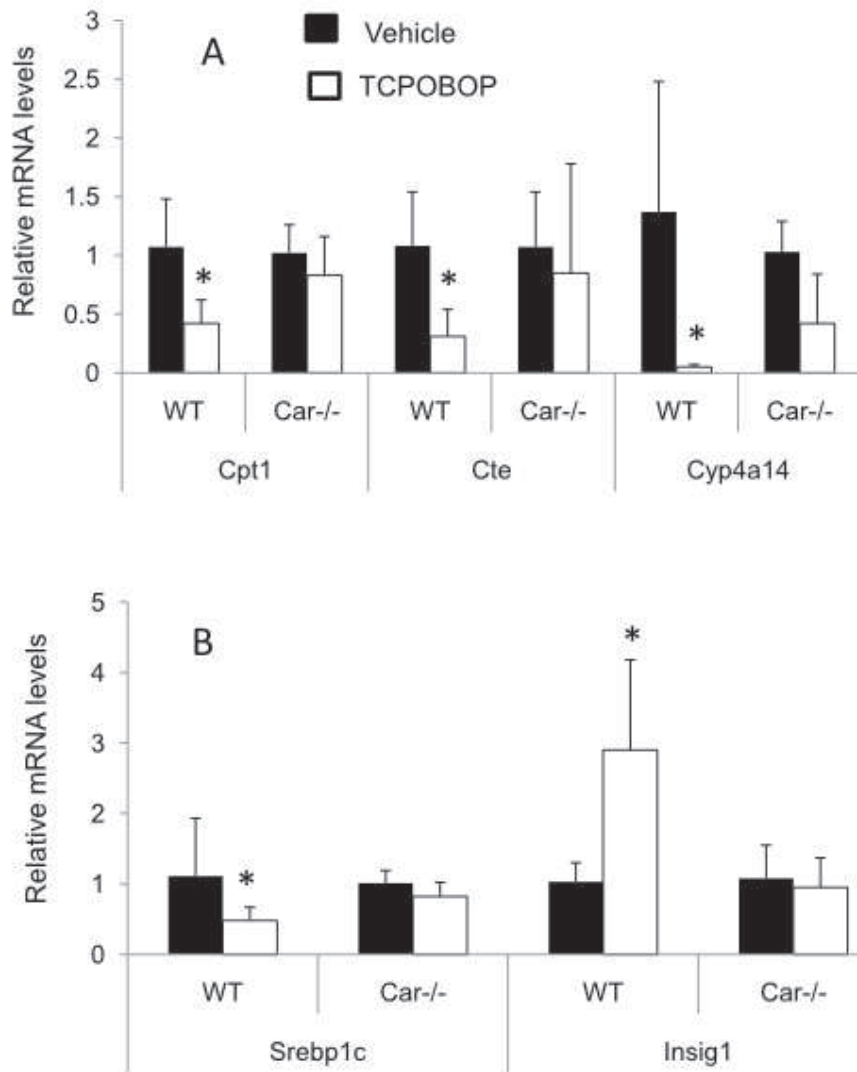
**RNA isolation and real-time PCR:** Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). 100 µg of RNA was reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, Random Primers and RNaseOUT inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA were quantified by real time PCR using a SYBR® Green Real-time PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) on a LightCycler 2.0 detection system (Roche Diagnostics, Meylan, France). Relative mRNA levels were determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Values were expressed relative to Gapdh levels. Sequences of the oligonucleotides are available upon request.

**Transient transfections and Luciferase transactivation assays:** The Vldlr luciferase constructs were obtained by inserting the -934, -676, -488 and -177 bp fragments of the mouse Vldlr gene promoter in the multicloning site of the pGL3 basic vector (Promega, Charboniere, France). Promoters fragments were obtained by PCR using high fidelity DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Human 293T cells were transiently transfected with expression plasmids pCMX-CAR and pSG5-RXR $\alpha$  and reporter plasmids using lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 24 hours, cells were treated with TCPOBOP until the end of the experiment. Luciferase was measured using the Dual Glo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions.



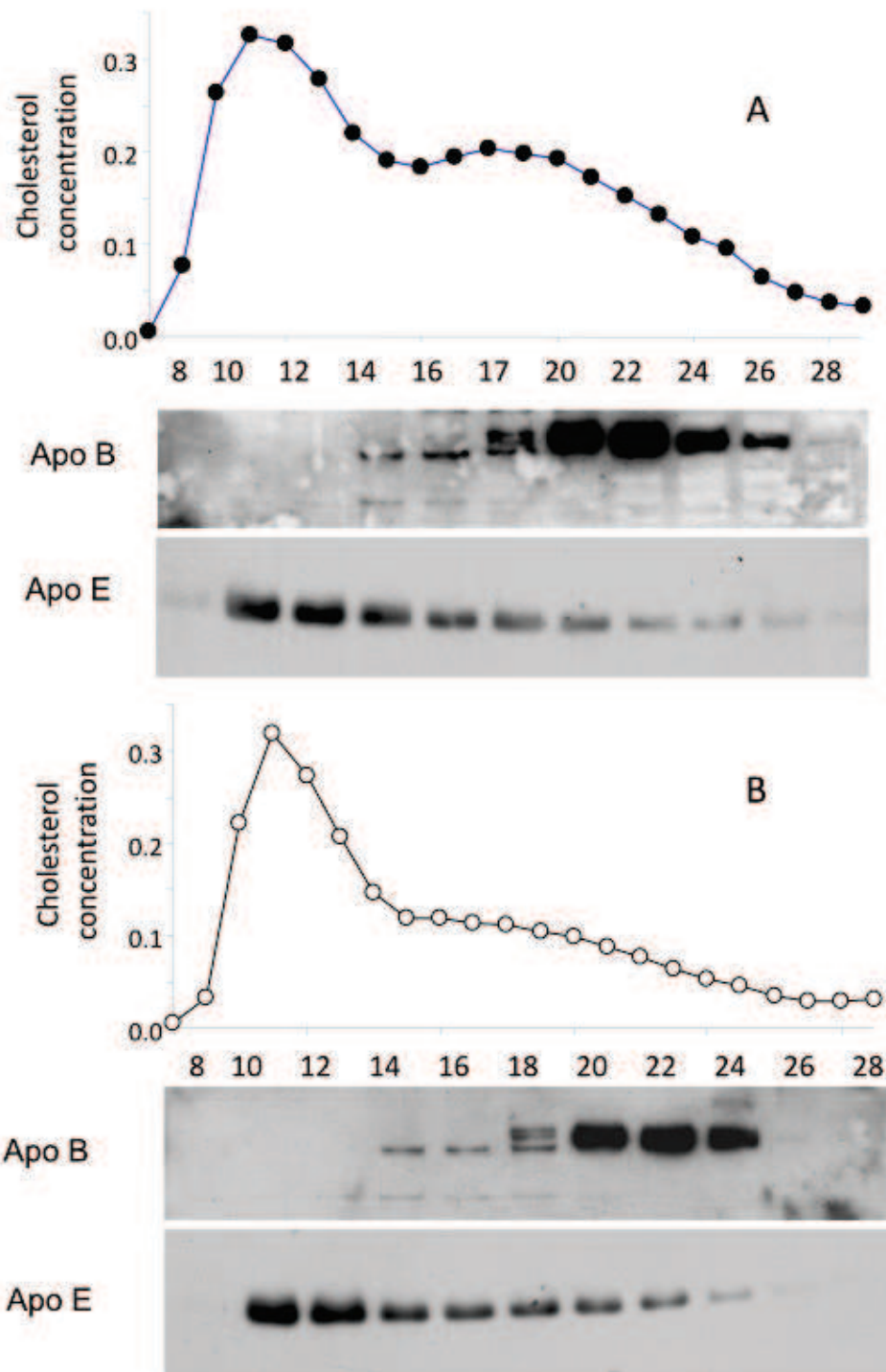
**Figure S1 : Body weight curve of Ldlr-/- mice treated or not with TCPOBOP**

Animals were fed a western diet during 2 months and were treated either with vehicle or TCPOBOP. Body weight was evaluated weekly all along the period of treatment.



**Figure S2: Effect of TCPOBOP treatment on hepatic gene expression in WT and Car<sup>-/-</sup> mice.** WT and Car<sup>-/-</sup> mice were treated by TCPOBOP or vehicle only and relative mRNA levels of selected genes were determined by real time PCR (A) Relative mRNA levels of genes involved in fatty acid catabolism. (B) Relative mRNA levels of genes involved in the control of lipogenesis. (n=5 in each cases, \*: P<0.05 Vs Vehicle group)

5

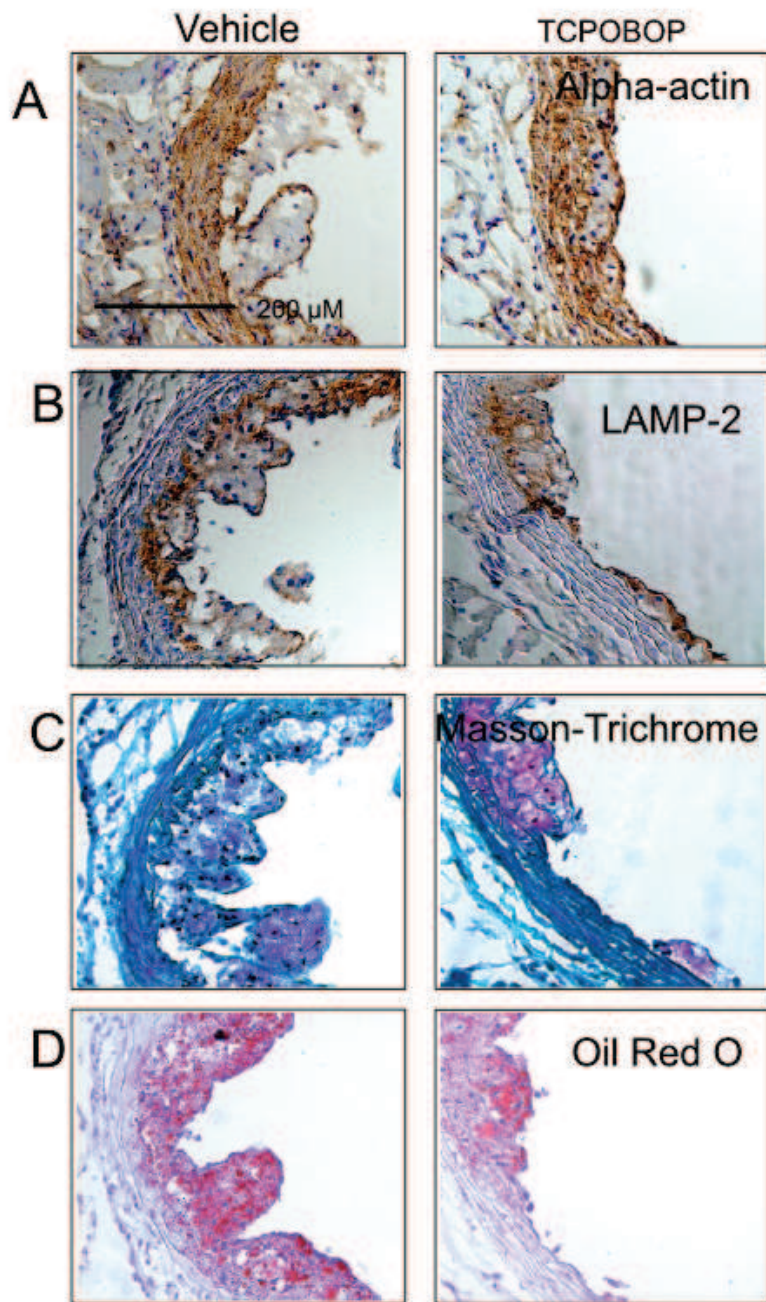


**Figure S3: ApoE and ApoB distribution in FPLC fractions in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.**

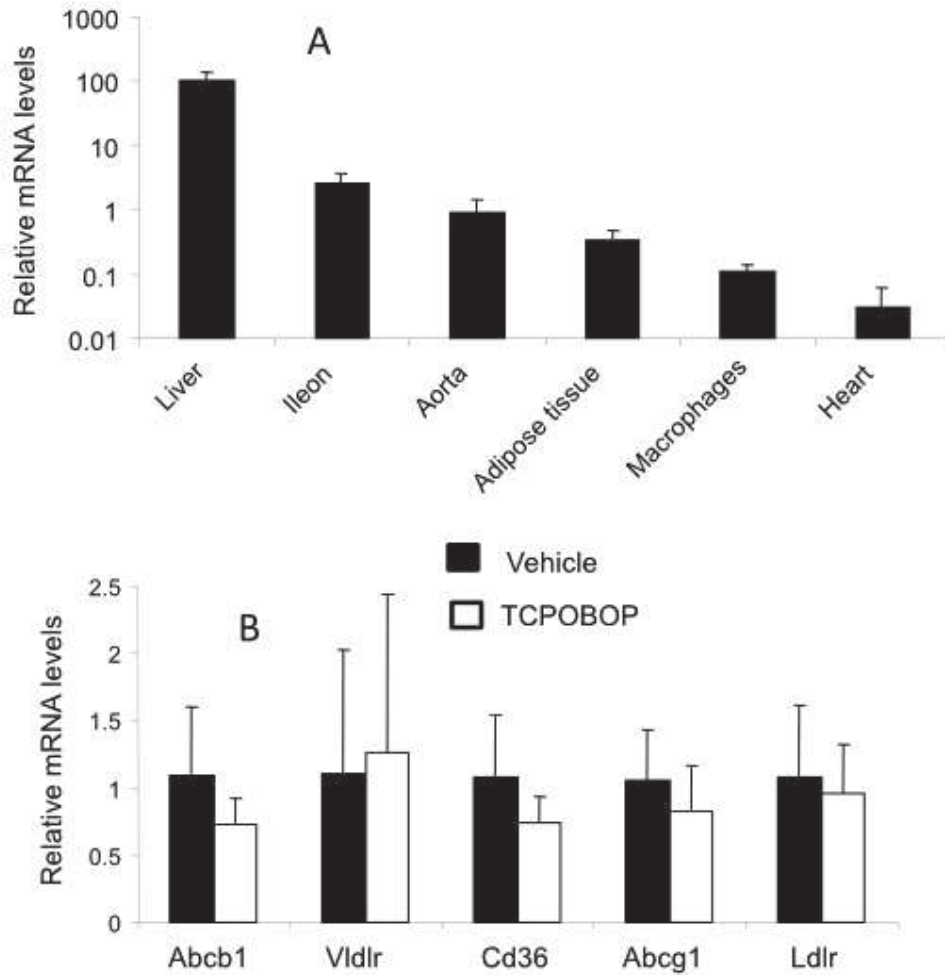
Cholesterol concentration as well as ApoB and apoE distribution in FPLC fractions from *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPBOP for 8 weeks. Pooled plasma samples (n= 5 in each case) were submitted to FPLC ApoE and APOB distribution were determined by western blot as describe in materials and methods. (A): Vehicle treated mice, (B): TCPOBOP treated mice.



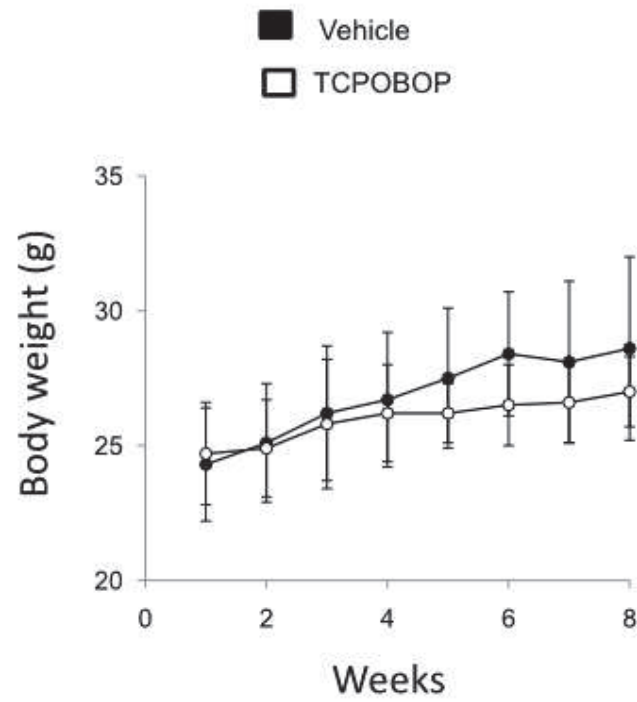
6



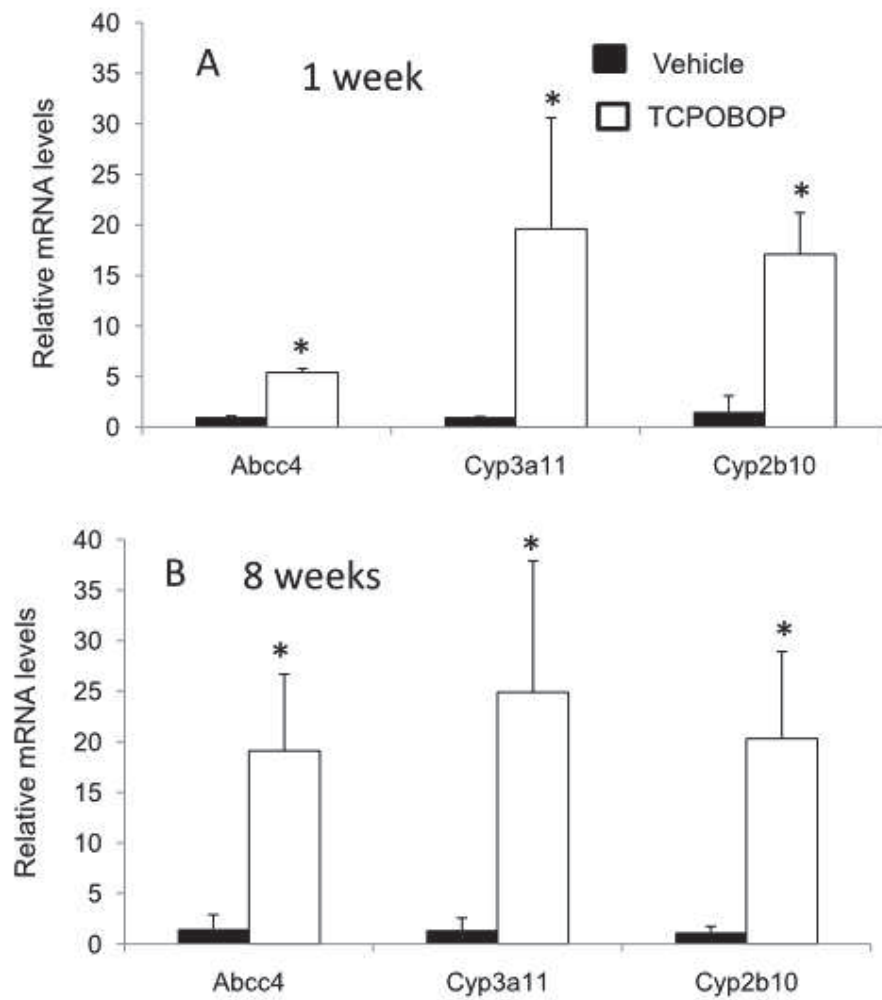
**Figure S4 : Immunohistological analysis of atherosclerotic lesion in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP and fed a Western type diet for 8 weeks. (A) Immunostaining for macrophages (Lamp2) and (B) SMCs (α-SMA) of sections from the proximal aorta, (C) Masson trichrome staining (D) oil red O staining**



**Figure S5: (A) Relative Car mRNA levels in different mouse tissues or cell types.** Total RNA were extracted from different tissues and relative Car mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. **(B) Effect of TCPOBOP treatment on the expression of selected genes in mouse macrophages.** Peritoneal mouse macrophages were treated in vitro with TCPOBOP (100 nM for 24 hours) and the relative mRNA levels of Abcb1, Vldlr, CD36, Abcg1 and Ldlr were determined by real time PCR as describe in materials and methods.



**Figure S6: Body weight curve of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice treated or not with TCPOBOP.** Animals were fed a western type diet during 2 months and were treated either with the vehicle or TCPOBOP. Body weight was evaluated weekly all along the period of treatment.



**Figure S7: Effect of TCPOBOP on the expression of Car target genes after 1 or 8 weeks of treatment.** ApoE<sup>-/-</sup> mice were sacrificed after one or 8 weeks of TCPOBOP treatment. In both cases mice were sacrificed 5 days after the last I.P. injection. Relative mRNA levels were determined by real time PCR as describe in materials and methods.

**Table S1 : Food intake, body weight and liver parameters of Ldlr -/-. Animals were fed a western diet during 2 months and were treated either with vehicle or TCPOBOP. Food intake was evaluated during the treatment, body weight gain was determined at the end of the treatment and liver and plasma were harvested 5 days after the last injection for mRNA and plasma parameters determination. Values represent the mean  $\pm$  SD. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.001**

	Food Intake	Body weight	Sult 2A1	Hepatic parameters		
	(g/day)	After 2 months	mRNA levels	ASAT (IU)	ALAT (IU)	Bilirubine (IU)
Vehicle <i>n</i> =10	4.43 $\pm$ 1.30	25.8 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.26	100 $\pm$ 22	33 $\pm$ 16	6.25 $\pm$ 0.71
TCPOBOP <i>n</i> =10	6.47 $\pm$ 1.88	24.0 $\pm$ 0.9*	42 $\pm$ 21**	180 $\pm$ 63*	100 $\pm$ 26**	6.00 $\pm$ 0.00

**Table SII : Food intake, body weight and liver parameters of ApoE <sup>-/-</sup>.** Animals were fed a western diet during 2 months and were treated either with vehicle or TCPOBOP. Food intake was evaluated during the treatment, body weight gain was determined at the end of the treatment and liver and plasma were harvested 5 days after the last injection for mRNA and plasma parameters determination. Values represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

	Food Intake (g/day)	Body weight After 2 months	Sult 2A1 mRNA levels	Hepatic parameters		
				ASAT (IU)	ALAT (IU)	Bilirubine (IU)
Vehicle <i>n</i> =9	3.87 $\pm$ 0.95	28.6 $\pm$ 3.4	1.45 $\pm$ 1.08	131 $\pm$ 89	93 $\pm$ 140	10.5 $\pm$ 13.9
TCPOBOP <i>n</i> =9	3.81 $\pm$ 0.70	27.0 $\pm$ 1.3*	19.3 $\pm$ 9.53**	254 $\pm$ 202*	268 $\pm$ 84**	10.75 $\pm$ 15.1

#### **Supplemental references**

1. Masson D, Staels B, Gautier T, Desrumaux C, Athias A, Le Guern N, Schneider M, Zak Z, Dumont L, Deckert V, Tall A, Jiang XC, Lagrost L. Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *J Lipid Res.* 2004;45:543-550.

## **IV. Résultats et discussion**

Dans cet article, les modèles utilisés (Ldlr<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>-/-</sup>) ont permis d'étudier les effets de CAR sur le métabolisme des lipoprotéines à apo-B, riches en triglycérides et en cholestérol.

Chez les souris Ldlr<sup>-/-</sup>, et comme précédemment décrit, une diminution du cholestérol associée à l'ensemble des classes de lipoprotéines incluant les VLDL, LDL/IDL et HDL a été observée, après la première injection de TCPOBOP. Une diminution du taux de triglycérides plasmatiques a également été mise en évidence. Après un et deux mois de traitement, des résultats sensiblement différents ont été observés. Après huit semaines de traitement, le cholestérol des fractions VLDL et HDL initialement diminué a atteint un niveau comparable à celui des souris non traitées, en revanche, la diminution du cholestérol LDL et des triglycérides a pu être observée tout au long du traitement. Ces résultats démontrent clairement que l'activation de CAR induit deux effets. D'une part, le TCPOBOP induit, après un traitement aigu, un effet transitoire sur les VLDL et le HDL et cet effet disparaît après deux mois de traitement, suggérant la mise en route de mécanismes compensatoires s'opposant à l'effet de CAR. D'autre part, la diminution du cholestérol LDL et des triglycérides persiste tout au long du traitement et doit être la conséquence de mécanismes différents, spécifiques de CAR.

Il existe une controverse à propos des effets de CAR sur le métabolisme des triglycérides. D'une part, l'activation de CAR diminue la triglycéridémie, la sécrétion de VLDL et la lipogénèse. Ces effets ont été associés à l'induction de Insig1 par CAR comme observé dans cet article. Insig1 régule négativement le facteur de transcription Srebp1c et s'oppose ainsi à la stimulation de la lipogénèse [23, 435-437]. Inversement, le traitement par TCPOBOP induit une augmentation de la triglycéridémie chez les souris sauvages sous régime riche en graisses [23]. De plus, l'activation de CAR diminue la  $\beta$ -oxydation, suggérant que CAR inhibe les voies métaboliques de PPAR $\alpha$  [384]. Les résultats de notre étude permettent d'apporter une explication aux différences observées.



Dans notre travail, en accord avec les études montrant l'impact négatif de CAR sur les voies PPAR $\alpha$ , le traitement par TCPOBOP diminue l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation et de gènes cibles de PPAR alpha comme Cpt1, Cyp4a14 et Cte1. A l'opposé et comme précédemment décrit, le gène Insig1, régulateur négatif de Srebp1c, est induit après traitement et les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse comme Srebp1c et Scd1 sont diminués. Ainsi, CAR est capable d'exercer des effets opposés sur le métabolisme des triglycérides et l'effet résultant semblerait être le résultat d'une balance subtile dépendant du contexte métabolique. Néanmoins, dans notre étude l'activation pharmacologique de CAR induit clairement une diminution du contenu hépatique en triglycérides et du taux de triglycérides plasmatiques, deux effets potentiellement bénéfiques en terme d'athérosclérose.

L'athérogénicité du profil lipoprotéique des souris Ldlr $^{-/-}$  dépend certes de la triglycéridémie mais surtout de l'accumulation de lipoprotéines riches en cholestérol, IDL et LDL. Dans notre étude, le traitement par TCPOBOP induit une diminution du LDL cholestérol alors que le VDL cholestérol ne varie pas. Ces données suggèrent un catabolisme accru des LDL chez les souris traitées par TCPOBOP. Parmi tous les récepteurs hépatiques capables de lier les LDL, seule l'expression du récepteur aux VLDL était significativement induite par le traitement (plus de 20 fois après 8 semaines de traitement). Ce récepteur a été découvert en 1986 par Brown et *al.* [466] et appartient à la famille du récepteur aux LDL [467]. Il est abondamment exprimé au niveau des tissus actifs dans le métabolisme des acides gras comme le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux, ainsi qu'au niveau des macrophages et du cerveau [467-474]. Il est en revanche peu exprimé dans le foie. Il reconnaît l'apolipoprotéine E et lie donc les VLDL, les IDL [469, 475, 476] ainsi que les chylomicrons remnants [477] et la lipoprotéine a [478]. A noter que chez l'Homme, les VLDL ne sont pas de bons ligands pour le récepteur aux VLDL [479], ainsi les IDL lient préférentiellement ce récepteur [480]. Le récepteur aux VLDL intervient également dans la capture des LDL en contexte dyslipidémique. Ce phénomène est lié à l'augmentation de l'apolipoprotéine E dans l'ensemble des classes de lipoprotéines. Ainsi, la surexpression du récepteur aux VLDL dans les cellules ovariennes de hamster déficientes pour le récepteur aux LDL, permet la liaison de l'apolipoprotéine E [481] et sa surexpression *in vivo* contribue à la diminution du taux de cholestérol plasmatique associé à la fraction non seulement des VLDL et IDL, mais aussi des LDL chez les souris apoE2/2 et E3\*Leiden [482-484].

La capacité du récepteur aux VLDL à diminuer le taux de LDL est également observée chez les souris déficientes pour le récepteur aux LDL chez lesquelles le récepteur aux VLDL a été surexprimé au niveau hépatique via des vecteurs d'origine virale [480, 485]. Le récepteur aux VLDL participe également à l'hydrolyse des triglycérides des VLDL et des chylomicrons en association avec la lipoprotéine lipase et à la capture cellulaire des acides gras libres [486]. Il participe aussi au catabolisme de la lipoprotéine lipase [487, 488].

La stimulation de ce récepteur semble donc être une hypothèse plausible pour expliquer la diminution du taux de lipoprotéines à apo-B chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>. En accord avec cette hypothèse, différentes études ont démontré que la surexpression hépatique du récepteur aux VLDL chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> induisait une diminution préférentielle du taux de LDL/IDL, des triglycérides, la régression des plaques athéromateuses et la diminution du contenu des lésions en macrophages [484, 485, 489-491].

Dans le modèle des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E et donc en l'absence du ligand physiologique pour le récepteur aux VLDL, l'impact du TCPOBOP sur le profil des lipoprotéines à apo-B est très nettement atténué ce qui renforce notre hypothèse. La régulation du récepteur aux VLDL par le TCPOBOP est dépendante de CAR : son induction est totalement abolie chez les souris CAR-déficientes et semblerait mettre en jeu une régulation directe puisque le TCPOBOP induit une augmentation de l'activité du promoteur du récepteur aux VLDL.

En accord avec les modifications potentiellement bénéfiques du profil lipidique, l'athérosclérose est significativement diminuée chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> traitées par TCPOBOP. Nous avons démontré précédemment (voir article 1) que CAR est capable de stimuler le transport réverse du cholestérol chez la Souris avec des conséquences positives en terme d'homéostasie du cholestérol et de susceptibilité à l'athérosclérose. Les données présentées dans ce deuxième article suggèrent que les mécanismes participant à la diminution des lésions puissent être également attribuables en partie aux effets bénéfiques de CAR sur le profil lipoprotéique au niveau systémique. Ainsi, dans notre étude précédente nous avons observé une diminution des lésions athéromateuses au niveau de l'arche aortique et de l'aorte descendante chez les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> traitées par le TCPOBOP.

Dans ce deuxième travail, bien qu'une tendance à la diminution des lésions au niveau de la valve aortique soit observée chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>, elle n'est pas statistiquement significative et la diminution est moins marquée que chez les souris Ldlr<sup>-/-</sup>. Il est important de souligner qu'à la différence des souris Ldlr<sup>-/-</sup>, les souris ApoE<sup>-/-</sup> traitées par TCPOBOP ne présentent pas de diminution significative du LDL cholestérol.

Il est donc probable que les deux effets de CAR (stimulation du transport réverse du cholestérol et diminution des concentrations circulantes de lipoprotéines à apo-B) contribuent chacun significativement à la réduction des lésions athéromateuses chez les animaux traités par TCPOBOP. Il semble par contre peu probable que CAR intervienne directement au niveau de la paroi vasculaire, car le récepteur est préférentiellement exprimé au niveau du foie et de l'intestin [260]. La morphologie des lésions est d'ailleurs similaire chez les animaux traités ou non par TCPOBOP.

# CONCLUSION

---

Le syndrome métabolique associe plusieurs anomalies métaboliques comme l'obésité, les dyslipidémies, le diabète et l'hypertension artérielle. L'incidence de ce syndrome est en nette croissance dans les pays développés. Il prédispose aux complications cardio-vasculaires et participe au développement de la stéatose hépatique non alcoolique.

Durant les années 1990, le rôle des récepteurs nucléaires dans la régulation de ce processus a fait l'objet de nombreuses études, offrant ainsi la perspective de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, les fibrates, agonistes du récepteur PPAR $\alpha$  sont utilisés chez l'Homme dans le traitement de l'hypertriglycéridémie [439, 492, 493]. A l'instar de PPAR $\alpha$ , d'autres récepteurs comme FXR et LXR ont été proposés pour le traitement des dyslipidémies et de l'athérosclérose [17, 18, 494-498]. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent leur action métabolique sont complexes et les nombreuses différences observées selon les modèles d'études et l'absence de données chez l'Homme ne permettent actuellement pas leur utilisation. Au sein de la sous-famille NR1 des récepteurs nucléaires à laquelle appartiennent LXR, FXR et PPAR $\alpha$ , le récepteur CAR initialement décrit pour son rôle dans la coordination de la détoxification des molécules exogènes comme les polluants et certains médicaments [446, 499, 500], a récemment été impliqué dans le métabolisme endogène des acides biliaires, des hormones thyroïdes et des triglycérides [23, 361, 406, 410, 435], faisant de ce récepteur particulier un acteur du métabolisme énergétique. Chez l'Homme, le phénobarbital, double agoniste CAR-PXR a été utilisé pendant de nombreuses années dans le traitement chronique de l'épilepsie mais les effets de cette molécule sur les paramètres lipidiques et métaboliques ne sont que partiellement caractérisés [355, 416-419]. L'utilisation d'un agoniste spécifique chez la Souris (TCPOBOP) a permis d'étudier le rôle propre de CAR dans ces phénomènes. Ainsi, CAR intervient dans la néoglucogenèse, la lipogenèse et le métabolisme des lipoprotéines. Les travaux présentés dans les articles 1 et 2 montrent que l'activation pharmacologique de CAR s'oppose à l'accumulation des lipides intra-hépatiques et améliore le profil lipoprotéique de souris dyslipidémiques, suggérant un rôle bénéfique à la fois dans le développement de la stéatose hépatique et de l'athérosclérose.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Gronemeyer H: **Transcription activation by nuclear receptors.** *J Recept Res* 1993, **13**(1-4):667-691.
2. Gronemeyer H, Laudet V: **Transcription factors 3: nuclear receptors.** *Protein Profile* 1995, **2**(11):1173-1308.
3. Gronemeyer H, Moras D: **Nuclear receptors. How to finger DNA.** *Nature* 1995, **375**(6528):190-191.
4. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P *et al*: **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell* 1995, **83**(6):835-839.
5. Jeong Y, Mangelsdorf DJ: **Nuclear receptor regulation of stemness and stem cell differentiation.** *Exp Mol Med* 2009, **41**(8):525-537.
6. Solt LA, Griffin PR, Burris TP: **Ligand regulation of retinoic acid receptor-related orphan receptors: implications for development of novel therapeutics.** *Curr Opin Lipidol* 2010, **21**(3):204-211.
7. Gyamfi MA, Wan YJ: **Pathogenesis of alcoholic liver disease: the role of nuclear receptors.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2010, **235**(5):547-560.
8. Margolis RN, Christakos S: **The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1192**:208-214.
9. Sertznig P, Dunlop T, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J: **Cross-talk between vitamin D receptor (VDR)- and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-signaling in melanoma cells.** *Anticancer Res* 2009, **29**(9):3647-3658.
10. Lalli E, Alonso J: **Targeting DAX-1 in embryonic stem cells and cancer.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**(2):169-177.
11. O'Malley BW, Kumar R: **Nuclear receptor coregulators in cancer biology.** *Cancer Res* 2009, **69**(21):8217-8222.
12. Schweitzer A, Knauer SK, Stauber RH: **Nuclear receptors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives.** *Int J Cancer* 2010, **126**(4):801-809.

13. Lu C, Cheng SY: **Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors.** *J Mol Endocrinol* 2010, **44**(3):143-154.
14. Tanaka T, De Luca LM: **Therapeutic potential of "rexinoids" in cancer prevention and treatment.** *Cancer Res* 2009, **69**(12):4945-4947.
15. Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target.** *Cancer Biol Ther* 2009, **8**(7):6-15.
16. Huang W, Glass CK: **Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(8):1542-1549.
17. Hageman J, Herrema H, Groen AK, Kuipers F: **A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(8):1519-1528.
18. Calkin AC, Tontonoz P: **Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(8):1513-1518.
19. Meyer MR, Barton M: **ERalpha, ERbeta, and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis.** *Cardiovasc Res* 2009, **83**(4):605-610.
20. Fruchart JC: **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease.** *Atherosclerosis* 2009, **205**(1):1-8.
21. Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD: **A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**(3):1544-1552.
22. Masson D, Qatanani M, Sberna AL, Xiao R, Pais de Barros JP, Grober J, Deckert V, Athias A, Gambert P, Lagrost L *et al*: **Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice.** *J Lipid Res* 2008, **49**(8):1682-1691.
23. Rezen T, Tamasi V, Lovgren-Sandblom A, Bjorkhem I, Meyer UA, Rozman D: **Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers.** *BMC Genomics* 2009, **10**:384.
24. Jensen EV: **On the mechanism of estrogen action.** *Perspect Biol Med* 1962, **6**:47-59.

25. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM: **Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.** *Nature* 1985, **318**(6047):635-641.
26. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J: **Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA.** *Science* 1986, **231**(4742):1150-1154.
27. Kostrouch Z, Kostrouchova M, Love W, Jannini E, Piatigorsky J, Rall JE: **Retinoic acid X receptor in the diploblast, Tripedalia cystophora.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(23):13442-13447.
28. **A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily.** *Cell* 1999, **97**(2):161-163.
29. Sluder AE, Maina CV: **Nuclear receptors in nematodes: themes and variations.** *Trends Genet* 2001, **17**(4):206-213.
30. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D: **Evolution of the nuclear receptor gene superfamily.** *EMBO J* 1992, **11**(3):1003-1013.
31. Laudet V: **Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor.** *J Mol Endocrinol* 1997, **19**(3):207-226.
32. Escriva H, Delaunay F, Laudet V: **Ligand binding and nuclear receptor evolution.** *Bioessays* 2000, **22**(8):717-727.
33. Thornton JW, DeSalle R: **A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily.** *Syst Biol* 2000, **49**(2):183-201.
34. Enmark E, Gustafsson JA: **Orphan nuclear receptors--the first eight years.** *Mol Endocrinol* 1996, **10**(11):1293-1307.
35. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W *et al*: **The P450 gene superfamily: recommended nomenclature.** *DNA* 1987, **6**(1):1-11.
36. Pettersson K, Gustafsson JA: **Role of estrogen receptor beta in estrogen action.** *Annu Rev Physiol* 2001, **63**:165-192.
37. Aranda A, Pascual A: **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol Rev* 2001, **81**(3):1269-1304.

38. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM: **Functional domains of the human glucocorticoid receptor.** *Cell* 1986, **46**(5):645-652.
39. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P: **The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors.** *EMBO J* 1986, **5**(5):891-897.
40. Benoit G, Cooney A, Giguere V, Ingraham H, Lazar M, Muscat G, Perlmann T, Renaud JP, Schwabe J, Sladek F *et al*: **International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors.** *Pharmacol Rev* 2006, **58**(4):798-836.
41. Beato M, Herrlich P, Schutz G: **Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot.** *Cell* 1995, **83**(6):851-857.
42. Zechel C, Shen XQ, Chen JY, Chen ZP, Chambon P, Gronemeyer H: **The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats.** *EMBO J* 1994, **13**(6):1425-1433.
43. Zechel C, Shen XQ, Chambon P, Gronemeyer H: **Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements.** *EMBO J* 1994, **13**(6):1414-1424.
44. Freedman LP: **Anatomy of the steroid receptor zinc finger region.** *Endocr Rev* 1992, **13**(2):129-145.
45. Glass CK: **Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers.** *Endocr Rev* 1994, **15**(3):391-407.
46. Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP: **Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(10):4175-4179.
47. Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM: **Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding.** *Science* 1993, **260**(5111):1117-1121.
48. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB: **Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats.** *Nature* 1995, **375**(6528):203-211.
49. Moras D, Gronemeyer H: **The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**(3):384-391.



50. Khorasanizadeh S, Rastinejad F: **Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**(6):384-390.
51. Umesono K, Evans RM: **Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors.** *Cell* 1989, **57**(7):1139-1146.
52. Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P: **Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors.** *EMBO J* 1992, **11**(10):3681-3694.
53. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: **Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha.** *Nature* 1995, **375**(6530):377-382.
54. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H: **A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors.** *Nat Struct Biol* 1996, **3**(1):87-94.
55. Bourguet W, Andry V, Iltis C, Klaholz B, Potier N, Van Dorsselaer A, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: **Heterodimeric complex of RAR and RXR nuclear receptor ligand-binding domains: purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis.** *Protein Expr Purif* 2000, **19**(2):284-288.
56. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H: **Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications.** *Trends Pharmacol Sci* 2000, **21**(10):381-388.
57. Gampe RT, Jr., Montana VG, Lambert MH, Miller AB, Bledsoe RK, Milburn MV, Kliewer SA, Willson TM, Xu HE: **Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors.** *Mol Cell* 2000, **5**(3):545-555.
58. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG: **Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors.** *EMBO J* 1992, **11**(3):1025-1033.
59. Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Chambon P: **Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity.** *EMBO J* 1994, **13**(22):5370-5382.
60. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V: **Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**(11):950-964.

61. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW: **Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**(6):657-666.
62. Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(12):7940-7944.
63. Webb P, Valentine C, Nguyen P, Price RH, Jr., Marimuthu A, West BL, Baxter JD, Kushner PJ: **ERbeta Binds N-CoR in the Presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus.** *Nucl Recept* 2003, **1**(1):4.
64. Hager GL, Nagaich AK, Johnson TA, Walker DA, John S: **Dynamics of nuclear receptor movement and transcription.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1677**(1-3):46-51.
65. Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM: **Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors.** *J Biol Chem* 2003, **278**(14):12425-12432.
66. Rayasam GV, Elbi C, Walker DA, Wolford R, Fletcher TM, Edwards DP, Hager GL: **Ligand-specific dynamics of the progesterone receptor in living cells and during chromatin remodeling in vitro.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(6):2406-2418.
67. Schaaf MJ, Cidlowski JA: **Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(6):1922-1934.
68. Reid J, Betney R, Watt K, McEwan IJ: **The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions.** *Biochem Soc Trans* 2003, **31**(Pt 5):1042-1046.
69. Pratt WB, Toft DO: **Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.** *Endocr Rev* 1997, **18**(3):306-360.
70. Pratt WB: **The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997, **37**:297-326.
71. Hager GL, Lim CS, Elbi C, Baumann CT: **Trafficking of nuclear receptors in living cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, **74**(5):249-254.
72. Baniahmad A, Leng X, Burris TP, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**(1):76-86.

73. Chen JD, Evans RM: **A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.** *Nature* 1995, **377**(6548):454-457.
74. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK *et al*: **Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.** *Nature* 1995, **377**(6548):397-404.
75. Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J: **Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors.** *Science* 1992, **256**(5053):107-110.
76. Giguere V: **Orphan nuclear receptors: from gene to function.** *Endocr Rev* 1999, **20**(5):689-725.
77. Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R: **Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain.** *Science* 1990, **249**(4965):157-160.
78. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB: **Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(11):5998-6003.
79. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM: **Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling.** *Nature* 1992, **355**(6359):446-449.
80. Cheskis B, Freedman LP: **Modulation of nuclear receptor interactions by ligands: kinetic analysis using surface plasmon resonance.** *Biochemistry* 1996, **35**(10):3309-3318.
81. Thompson JR, Bratt JM, Banaszak LJ: **Crystal structure of cellular retinoic acid binding protein I shows increased access to the binding cavity due to formation of an intermolecular beta-sheet.** *J Mol Biol* 1995, **252**(4):433-446.
82. Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR: **Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions.** *J Biol Chem* 1998, **273**(14):8483-8491.
83. Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R: **Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers.** *Cell* 2004, **116**(3):417-429.
84. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG: **A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors.** *Nature* 1997, **387**(6634):733-736.

85. Hu X, Lazar MA: **The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors.** *Nature* 1999, **402**(6757):93-96.
86. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG: **Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification.** *Trends Endocrinol Metab* 2002, **13**(2):55-60.
87. Rosenfeld MG, Glass CK: **Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors.** *J Biol Chem* 2001, **276**(40):36865-36868.
88. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR: **Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions.** *Genes Dev* 1998, **12**(21):3343-3356.
89. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV: **Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.** *Nature* 1998, **395**(6698):137-143.
90. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL: **The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.** *Cell* 1998, **95**(7):927-937.
91. McKenna NJ, O'Malley BW: **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.** *Cell* 2002, **108**(4):465-474.
92. Cairns BR, Levinson RS, Yamamoto KR, Kornberg RD: **Essential role of Swp73p in the function of yeast Swi/Snf complex.** *Genes Dev* 1996, **10**(17):2131-2144.
93. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.** *Science* 1995, **270**(5240):1354-1357.
94. Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK *et al*: **A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.** *Cell* 1996, **85**(3):403-414.
95. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS: **AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer.** *Science* 1997, **277**(5328):965-968.
96. Chen H, Hung MC: **Involvement of co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene.** *J Biol Chem* 1997, **272**(10):6101-6104.

97. Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR: **GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(5):2735-2744.
98. Li H, Gomes PJ, Chen JD: **RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(16):8479-8484.
99. Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS, Chin WW: **TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1.** *J Biol Chem* 1997, **272**(44):27629-27634.
100. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG: **The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function.** *Nature* 1997, **387**(6634):677-684.
101. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H: **TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors.** *EMBO J* 1996, **15**(14):3667-3675.
102. Lonard DM, Kumar R, O'Malley BW: **Minireview: the SRC family of coactivators: an entree to understanding a subset of polygenic diseases?** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(2):279-285.
103. Xu PL, Liu YQ, Shan SF, Kong YY, Zhou Q, Li M, Ding JP, Xie YH, Wang Y: **Molecular mechanism for the potentiation of the transcriptional activity of human liver receptor homolog 1 by steroid receptor coactivator-1.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(8):1887-1905.
104. Xu J, O'Malley BW: **Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function.** *Rev Endocr Metab Disord* 2002, **3**(3):185-192.
105. Chen HW, Privalsky ML: **Retinoid X and retinoic acid receptors interact with transcription factor II-B by distinct mechanisms.** *Mol Cell Endocrinol* 1997, **129**(1):55-61.
106. Vo N, Fjeld C, Goodman RH: **Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(18):6181-6188.
107. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T *et al*: **Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity.** *J Biol Chem* 2001, **276**(21):18375-18383.

108. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR: **Regulation of transcription by a protein methyltransferase.** *Science* 1999, **284**(5423):2174-2177.
109. Fryer CJ, Archer TK: **Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex.** *Nature* 1998, **393**(6680):88-91.
110. Dilworth FJ, Fromental-Ramain C, Yamamoto K, Chambon P: **ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro.** *Mol Cell* 2000, **6**(5):1049-1058.
111. DiRenzo J, Shang Y, Phelan M, Sif S, Myers M, Kingston R, Brown M: **BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(20):7541-7549.
112. Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR: **Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities.** *J Biol Chem* 2001, **276**(2):1089-1098.
113. Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P *et al*: **Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor.** *Science* 2001, **293**(5531):853-857.
114. Fondell JD, Ge H, Roeder RG: **Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(16):8329-8333.
115. Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP: **A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system.** *Genes Dev* 1998, **12**(12):1787-1800.
116. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** *Cell* 1998, **92**(6):829-839.
117. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT *et al*: **Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha.** *Nature* 2002, **415**(6873):813-817.
118. Li H, Leo C, Schroen DJ, Chen JD: **Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**(13):2025-2037.

119. Ordentlich P, Downes M, Xie W, Genin A, Spinner NB, Evans RM: **Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(6):2639-2644.
120. Park EJ, Schroen DJ, Yang M, Li H, Li L, Chen JD: **SMRTe, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors-extended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(7):3519-3524.
121. Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG: **Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction.** *Genes Dev* 1999, **13**(24):3198-3208.
122. Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR *et al*: **A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.** *Nature* 1997, **387**(6628):43-48.
123. Laherty CD, Billin AN, Lavinsky RM, Yochum GS, Bush AC, Sun JM, Mullen TM, Davie JR, Rose DW, Glass CK *et al*: **SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors.** *Mol Cell* 1998, **2**(1):33-42.
124. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM: **Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase.** *Cell* 1997, **89**(3):373-380.
125. Privalsky ML: **The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors.** *Annu Rev Physiol* 2004, **66**:315-360.
126. Fowler AM, Alarid ET: **Dynamic control of nuclear receptor transcription.** *Sci STKE* 2004, **2004**(256):pe51.
127. Fowler AM, Alarid ET: **Nuclear receptor and transcriptional complex cycles.** *Sci STKE* 2004, **2004**(262):tr11.
128. Shipley JM, Waxman DJ: **Simultaneous, bidirectional inhibitory crosstalk between PPAR and STAT5b.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, **199**(3):275-284.
129. Choi HS, Chung M, Tzamelis I, Simha D, Lee YK, Seol W, Moore DD: **Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR.** *J Biol Chem* 1997, **272**(38):23565-23571.
130. Kanno Y, Aoki S, Mochizuki M, Mori E, Nakahama T, Inouye Y: **Expression of constitutive androstane receptor splice variants in rat liver and lung and their functional properties.** *Biol Pharm Bull* 2005, **28**(11):2058-2062.

131. Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD: **Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta.** *Nature* 1998, **395**(6702):612-615.
132. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ: **A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor.** *Nature* 1995, **378**(6558):690-697.
133. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: **Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid.** *Nature* 1995, **378**(6558):681-689.
134. Bicknell DC, Gower DB: **The development and application of a radioimmunoassay for 5alpha-androst-16-en-3alpha-ol in plasma.** *J Steroid Biochem* 1976, **7**(6-7):451-455.
135. Louveau I, Bonneau M, Gower DB: **Biosynthesis of 16-androstene steroids and testosterone by porcine testis tissue in vitro: effect of age and relationships with fat 5 alpha-androstenone levels in vivo.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991, **125**(5):526-531.
136. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ: **An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.** *Nature* 1996, **383**(6602):728-731.
137. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA *et al*: **Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.** *J Biol Chem* 1997, **272**(6):3137-3140.
138. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA: **Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.** *J Biol Chem* 1997, **272**(6):3406-3410.
139. Lala DS, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA: **Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(10):4895-4900.
140. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ, Jr., Evans RM: **The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(20):10588-10593.
141. Forman BM, Chen J, Evans RM: **Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(9):4312-4317.



142. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M: **The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(10):5652-5658.
143. Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M: **The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene.** *J Biol Chem* 1999, **274**(10):6043-6046.
144. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M: **Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(9):6318-6322.
145. Handschin C, Blattler S, Roth A, Looser R, Oscarson M, Kaufmann MR, Podvynec M, Gnerre C, Meyer UA: **The evolution of drug-activated nuclear receptors: one ancestral gene diverged into two xenosensor genes in mammals.** *Nucl Recept* 2004, **2**(1):7.
146. Krasowski MD, Yasuda K, Hagey LR, Schuetz EG: **Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors).** *Nucl Recept* 2005, **3**:2.
147. Auerbach SS, Ramsden R, Stoner MA, Verlinde C, Hassett C, Omiecinski CJ: **Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(12):3194-3207.
148. Savkur RS, Wu Y, Bramlett KS, Wang M, Yao S, Perkins D, Totten M, Searfoss G, 3rd, Ryan TP, Su EW *et al*: **Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor.** *Mol Genet Metab* 2003, **80**(1-2):216-226.
149. Xiao L, Cui X, Madison V, White RE, Cheng KC: **Insights from a three-dimensional model into ligand binding to constitutive active receptor.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**(9):951-956.
150. Arnold KA, Eichelbaum M, Burk O: **Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor.** *Nucl Recept* 2004, **2**(1):1.
151. Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Ishida S, Saeki M, Soyama A, Itoda M, Nishimura T, Saito Y, Ozawa S *et al*: **Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**(3):496-502.
152. Lamba J, Lamba V, Schuetz E: **Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics.** *Curr Drug Metab* 2005, **6**(4):369-383.

153. di Masi A, Marinis ED, Ascenzi P, Marino M: **Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects.** *Mol Aspects Med* 2009.
154. Suino K, Peng L, Reynolds R, Li Y, Cha JY, Repa JJ, Kliewer SA, Xu HE: **The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization.** *Mol Cell* 2004, **16**(6):893-905.
155. Frank C, Molnar F, Matilainen M, Lempiainen H, Carlberg C: **Agonist-dependent and agonist-independent transactivations of the human constitutive androstane receptor are modulated by specific amino acid pairs.** *J Biol Chem* 2004, **279**(32):33558-33566.
156. Wang H, Tompkins LM: **CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme.** *Curr Drug Metab* 2008, **9**(7):598-610.
157. Jackson JP, Ferguson SS, Moore R, Negishi M, Goldstein JA: **The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**(6):1397-1404.
158. Honkakoski P, Jaaskelainen I, Kortelahti M, Urtti A: **A novel drug-regulated gene expression system based on the nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR).** *Pharm Res* 2001, **18**(2):146-150.
159. Toell A, Kroncke KD, Kleinert H, Carlberg C: **Orphan nuclear receptor binding site in the human inducible nitric oxide synthase promoter mediates responsiveness to steroid and xenobiotic ligands.** *J Cell Biochem* 2002, **85**(1):72-82.
160. Makinen J, Frank C, Jyrkkarinne J, Gynther J, Carlberg C, Honkakoski P: **Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**(2):366-378.
161. Smirlis D, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR, Shephard EA: **Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics.** *J Biol Chem* 2001, **276**(16):12822-12826.
162. Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS, Evans RM: **Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR.** *Genes Dev* 2000, **14**(23):3014-3023.
163. Wang H, Faucette S, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M, LeCluyse E: **Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin.** *J Biol Chem* 2004, **279**(28):29295-29301.
164. Faucette SR, Sueyoshi T, Smith CM, Negishi M, Lecluyse EL, Wang H: **Differential regulation of hepatic CYP2B6 and CYP3A4 genes by constitutive androstane**

- receptor but not pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **317**(3):1200-1209.
165. Burk O, Arnold KA, Nussler AK, Schaeffeler E, Efimova E, Avery BA, Avery MA, Fromm MF, Eichelbaum M: **Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2005, **67**(6):1954-1965.
166. Yoshinari K, Yoda N, Toriyabe T, Yamazoe Y: **Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region.** *Biochem Pharmacol* 2010, **79**(2):261-269.
167. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA: **Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor.** *J Biol Chem* 2002, **277**(4):2908-2915.
168. Miao J, Fang S, Bae Y, Kemper JK: **Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha.** *J Biol Chem* 2006, **281**(21):14537-14546.
169. Stoner MA, Auerbach SS, Zamule SM, Strom SC, Omiecinski CJ: **Transactivation of a DR-1 PPRE by a human constitutive androstane receptor variant expressed from internal protein translation start sites.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(7):2177-2190.
170. Page JL, Strom SC, Omiecinski CJ: **Regulation of the human cathepsin E gene by the constitutive androstane receptor.** *Arch Biochem Biophys* 2007, **467**(1):132-138.
171. Cervený L, Svecová L, Anzenbacherová E, Vrzal R, Staud F, Dvorák Z, Ulrichová J, Anzenbacher P, Pavek P: **Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(7):1032-1041.
172. Auerbach SS, Stoner MA, Su S, Omiecinski CJ: **Retinoid X receptor-alpha-dependent transactivation by a naturally occurring structural variant of human constitutive androstane receptor (NR1I3).** *Mol Pharmacol* 2005, **68**(5):1239-1253.
173. Auerbach SS, Dekeyser JG, Stoner MA, Omiecinski CJ: **CAR2 displays unique ligand binding and RXRalpha heterodimerization characteristics.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(3):428-439.

174. Ferguson SS, Chen Y, LeCluyse EL, Negishi M, Goldstein JA: **Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha.** *Mol Pharmacol* 2005, **68**(3):747-757.
175. Kassam A, Winrow CJ, Fernandez-Rachubinski F, Capone JP, Rachubinski RA: **The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation.** *J Biol Chem* 2000, **275**(6):4345-4350.
176. Sakai H, Iwata H, Kim EY, Tanabe S, Baba N: **Identification of constitutive androstane receptor cDNA in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*).** *Mar Environ Res* 2004, **58**(2-5):107-111.
177. Jyrkkarinne J, Windshugel B, Makinen J, Ylisirnio M, Perakyla M, Poso A, Sippl W, Honkakoski P: **Amino acids important for ligand specificity of the human constitutive androstane receptor.** *J Biol Chem* 2005, **280**(7):5960-5971.
178. Shan L, Vincent J, Brunzelle JS, Dussault I, Lin M, Ianculescu I, Sherman MA, Forman BM, Fernandez EJ: **Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androstenol: a molecular basis for inverse agonism.** *Mol Cell* 2004, **16**(6):907-917.
179. Xu RX, Lambert MH, Wisely BB, Warren EN, Weinert EE, Waitt GM, Williams JD, Collins JL, Moore LB, Willson TM *et al*: **A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer.** *Mol Cell* 2004, **16**(6):919-928.
180. Dussault I, Lin M, Hollister K, Fan M, Termini J, Sherman MA, Forman BM: **A structural model of the constitutive androstane receptor defines novel interactions that mediate ligand-independent activity.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(15):5270-5280.
181. Tzameli I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD: **The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(9):2951-2958.
182. Ueda A, Kakizaki S, Negishi M, Sueyoshi T: **Residue threonine 350 confers steroid hormone responsiveness to the mouse nuclear orphan receptor CAR.** *Mol Pharmacol* 2002, **61**(6):1284-1288.
183. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM *et al*: **Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes.** *J Biol Chem* 2003, **278**(19):17277-17283.

184. Moore DD: **CAR: three new models for a problem child.** *Cell Metab* 2005, **1**(1):6-8.
185. Takizawa D, Kakizaki S, Horiguchi N, Tojima H, Yamazaki Y, Ichikawa T, Sato K, Mori M: **Histone deacetylase inhibitors induce cytochrome P450 2B by activating nuclear receptor constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2010, **38**(9):1493-1498.
186. Lempiainen H, Molnar F, Macias Gonzalez M, Perakyla M, Carlberg C: **Antagonist- and inverse agonist-driven interactions of the vitamin D receptor and the constitutive androstane receptor with corepressor protein.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(9):2258-2272.
187. Xia J, Liao L, Sarkar J, Matsumoto K, Reddy JK, Xu J, Kemper B: **Redundant enhancement of mouse constitutive androstane receptor transactivation by p160 coactivator family members.** *Arch Biochem Biophys* 2007, **468**(1):49-57.
188. Min G, Kemper JK, Kemper B: **Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo.** *J Biol Chem* 2002, **277**(29):26356-26363.
189. Tzameli I, Moore DD: **Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR.** *Trends Endocrinol Metab* 2001, **12**(1):7-10.
190. Zhang Q, Bae Y, Kemper JK, Kemper B: **Analysis of multiple nuclear receptor binding sites for CAR/RXR in the phenobarbital responsive unit of CYP2B2.** *Arch Biochem Biophys* 2006, **451**(2):119-127.
191. Wright E, Vincent J, Fernandez EJ: **Thermodynamic characterization of the interaction between CAR-RXR and SRC-1 peptide by isothermal titration calorimetry.** *Biochemistry* 2007, **46**(3):862-870.
192. Choi E, Lee S, Yeom SY, Kim GH, Lee JW, Kim SW: **Characterization of activating signal cointegrator-2 as a novel transcriptional coactivator of the xenobiotic nuclear receptor constitutive androstane receptor.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(7):1711-1719.
193. Surapureddi S, Rana R, Reddy JK, Goldstein JA: **Nuclear receptor coactivator 6 mediates the synergistic activation of human cytochrome P-450 2C9 by the constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4alpha.** *Mol Pharmacol* 2008, **74**(3):913-923.
194. Jyrkkarinne J, Windshugel B, Ronkko T, Tervo AJ, Kublbeck J, Lahtela-Kakkonen M, Sippl W, Poso A, Honkakoski P: **Insights into ligand-elicited activation of human constitutive androstane receptor based on novel agonists and three-dimensional quantitative structure-activity relationship.** *J Med Chem* 2008, **51**(22):7181-7192.

195. Yun HJ, Kwon J, Seol W: **Specific inhibition of transcriptional activity of the constitutive androstane receptor (CAR) by the splicing factor SF3a3.** *Biol Chem* 2008, **389**(10):1313-1318.
196. Bae Y, Kemper JK, Kemper B: **Repression of CAR-mediated transactivation of CYP2B genes by the orphan nuclear receptor, short heterodimer partner (SHP).** *DNA Cell Biol* 2004, **23**(2):81-91.
197. Xie YB, Nedumaran B, Choi HS: **Molecular characterization of SMILE as a novel corepressor of nuclear receptors.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(12):4100-4115.
198. Andersin T, Vaisanen S, Carlberg C: **The critical role of carboxy-terminal amino acids in ligand-dependent and -independent transactivation of the constitutive androstane receptor.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(2):234-246.
199. DeKeyser JG, Stagliano MC, Auerbach SS, Prabhu KS, Jones AD, Omiecinski CJ: **Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2.** *Mol Pharmacol* 2009, **75**(5):1005-1013.
200. Chen T, Tompkins LM, Li L, Li H, Kim G, Zheng Y, Wang H: **A single amino acid controls the functional switch of human constitutive androstane receptor (CAR) 1 to the xenobiotic-sensitive splicing variant CAR3.** *J Pharmacol Exp Ther* 2010, **332**(1):106-115.
201. Zelko I, Sueyoshi T, Kawamoto T, Moore R, Negishi M: **The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(8):2838-2846.
202. Li H, Chen T, Cottrell J, Wang H: **Nuclear translocation of adenoviral-enhanced yellow fluorescent protein-tagged-human constitutive androstane receptor (hCAR): a novel tool for screening hCAR activators in human primary hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2009, **37**(5):1098-1106.
203. Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M: **Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital.** *FEBS Lett* 2003, **548**(1-3):17-20.
204. Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, Negishi M: **Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**(5):1069-1075.
205. Sueyoshi T, Moore R, Sugatani J, Matsumura Y, Negishi M: **PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2008, **73**(4):1113-1121.

206. Zelko I, Negishi M: **Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **277**(1):1-6.
207. Koike C, Moore R, Negishi M: **Localization of the nuclear receptor CAR at the cell membrane of mouse liver.** *FEBS Lett* 2005, **579**(30):6733-6736.
208. Swales K, Negishi M: **CAR, driving into the future.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(7):1589-1598.
209. Mutoh S, Osabe M, Inoue K, Moore R, Pedersen L, Perera L, Reboloso Y, Sueyoshi T, Negishi M: **Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3).** *J Biol Chem* 2009, **284**(50):34785-34792.
210. Hosseinpour F, Moore R, Negishi M, Sueyoshi T: **Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**(4):1095-1102.
211. Kakizaki S, Yamazaki Y, Kosone T, Horiguchi N, Sohara N, Sato K, Takagi H, Yoshinari K, Mori M: **Gene expression profiles of drug-metabolizing enzymes and transporters with an overexpression of hepatocyte growth factor.** *Liver Int* 2007, **27**(1):109-119.
212. Thasler WE, Dayoub R, Muhlbauer M, Hellerbrand C, Singer T, Grabe A, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS: **Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augments liver regeneration.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**(2):822-829.
213. Koike C, Moore R, Negishi M: **Extracellular signal-regulated kinase is an endogenous signal retaining the nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR) in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes.** *Mol Pharmacol* 2007, **71**(5):1217-1221.
214. Le Vee M, Lecureur V, Moreau A, Stieger B, Fardel O: **Differential regulation of drug transporter expression by hepatocyte growth factor in primary human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2009, **37**(11):2228-2235.
215. Osabe M, Sugatani J, Takemura A, Kurosawa M, Yamazaki Y, Ikari A, Miwa M: **Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress.** *FEBS Lett* 2009, **583**(5):885-889.
216. Xia J, Kemper B: **Structural determinants of constitutive androstane receptor required for its glucocorticoid receptor interacting protein-1-mediated nuclear accumulation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(8):7285-7293.

217. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM: **DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals.** *Curr Biol* 2001, **11**(22):1749-1758.
218. Xia J, Kemper B: **Subcellular trafficking signals of constitutive androstane receptor: evidence for a nuclear export signal in the DNA-binding domain.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(9):1489-1494.
219. Nigg EA: **Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation.** *Nature* 1997, **386**(6627):779-787.
220. Kanno Y, Suzuki M, Nakahama T, Inouye Y: **Characterization of nuclear localization signals and cytoplasmic retention region in the nuclear receptor CAR.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1745**(2):215-222.
221. Kanno Y, Suzuki M, Miyazaki Y, Matsuzaki M, Nakahama T, Kurose K, Sawada J, Inouye Y: **Difference in nucleocytoplasmic shuttling sequences of rat and human constitutive active/androstane receptor.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**(6):934-944.
222. Kanno Y, Miyazaki Y, Inouye Y: **The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1803**(8):968-974.
223. Dvorak Z, Modriansky M, Pichard-Garcia L, Balaguer P, Vilarem MJ, Ulrichova J, Maurel P, Pascussi JM: **Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**(1):160-169.
224. Dvorak Z, Maurel P, Vilarem MJ, Ulrichova J, Modriansky M: **Expression and transcriptional activities of nuclear receptors involved in regulation of drug-metabolizing enzymes are not altered by colchicine: focus on PXR, CAR, and GR in primary human hepatocytes.** *Cell Biol Toxicol* 2007, **23**(2):63-73.
225. Kanno Y, Miyama Y, Ando M, Inouye Y: **Dependence on the microtubule network and 90-kDa heat shock protein of phenobarbital-induced nuclear translocation of the rat constitutive androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2010, **77**(2):311-316.
226. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ: **Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation.** *Mol Pharmacol* 2000, **58**(6):1441-1450.



227. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ: **The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1619**(3):243-253.
228. Braeuning A, Ittrich C, Kohle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, Schwarz M: **Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes.** *FEBS J* 2006, **273**(22):5051-5061.
229. Doherty MM, Charman WN: **The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism?** *Clin Pharmacokinet* 2002, **41**(4):235-253.
230. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W: **The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity.** *J Biol Chem* 2009, **284**(38):25984-25992.
231. Ellero S, Chakhtoura G, Barreau C, Langouet S, Benelli C, Penicaud L, Beaune P, de Waziers I: **Xenobiotic-metabolizing cytochromes p450 in human white adipose tissue: expression and induction.** *Drug Metab Dispos* 2010, **38**(4):679-686.
232. Ledda-Columbano GM, Pibiri M, Concas D, Molotzu F, Simbula G, Cossu C, Columbano A: **Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP.** *Carcinogenesis* 2003, **24**(6):1059-1065.
233. Poland A, Mak I, Glover E, Boatman RJ, Ebetino FH, Kende AS: **1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity.** *Mol Pharmacol* 1980, **18**(3):571-580.
234. Pitot HC, Barsness L, Goldsworthy T, Kitagawa T: **Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine.** *Nature* 1978, **271**(5644):456-458.
235. Xu YH, Campbell HA, Sattler GL, Hendrich S, Maronpot R, Sato K, Pitot HC: **Quantitative stereological analysis of the effects of age and sex on multistage hepatocarcinogenesis in the rat by use of four cytochemical markers.** *Cancer Res* 1990, **50**(3):472-479.
236. Weghorst CM, Klaunig JE: **Phenobarbital promotion in diethylnitrosamine-initiated infant B6C3F1 mice: influence of gender.** *Carcinogenesis* 1989, **10**(3):609-612.
237. Weghorst CM, Pereira MA, Klaunig JE: **Strain differences in hepatic tumor promotion by phenobarbital in diethylnitrosamine- and dimethylnitrosamine-initiated infant male mice.** *Carcinogenesis* 1989, **10**(8):1409-1412.

238. Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M: **Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**(11):1897-1905.
239. Petrick JS, Klaassen CD: **Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(10):1806-1815.
240. Yoshinari K, Sueyoshi T, Moore R, Negishi M: **Nuclear receptor CAR as a regulatory factor for the sexually dimorphic induction of CYB2B1 gene by phenobarbital in rat livers.** *Mol Pharmacol* 2001, **59**(2):278-284.
241. Anakk S, Huang W, Staudinger JL, Tan K, Cole TJ, Moore DD, Strobel HW: **Gender dictates the nuclear receptor-mediated regulation of CYP3A44.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(1):36-42.
242. Hernandez JP, Mota LC, Huang W, Moore DD, Baldwin WS: **Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR).** *Toxicology* 2009, **256**(1-2):53-64.
243. Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P: **Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor.** *J Biol Chem* 2002, **277**(1):209-217.
244. Pascussi JM, Busson-Le Coniat M, Maurel P, Vilarem MJ: **Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(1):42-55.
245. Patel RD, Hollingshead BD, Omiecinski CJ, Perdew GH: **Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver.** *Hepatology* 2007, **46**(1):209-218.
246. Benet M, Lahoz A, Guzman C, Castell JV, Jover R: **CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) synergistically cooperate with constitutive androstane receptor to transactivate the human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) gene: application to the development of a metabolically competent human hepatic cell model.** *J Biol Chem* 2010, **285**(37):28457-28471.
247. Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ *et al*: **The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4.** *Nat Med* 2003, **9**(2):220-224.

248. Chen Y, Kissling G, Negishi M, Goldstein JA: **The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4alpha to synergistically activate the human CYP2C9 promoter.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **314**(3):1125-1133.
249. Rana R, Chen Y, Ferguson SS, Kissling GE, Surapureddi S, Goldstein JA: **Hepatocyte nuclear factor 4{alpha} regulates rifampicin-mediated induction of CYP2C genes in primary cultures of human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2010, **38**(4):591-599.
250. Ding X, Lichti K, Kim I, Gonzalez FJ, Staudinger JL: **Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha.** *J Biol Chem* 2006, **281**(36):26540-26551.
251. Pascussi JM, Robert A, Moreau A, Ramos J, Bioulac-Sage P, Navarro F, Blanc P, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ: **Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms.** *Hepatology* 2007, **45**(5):1146-1153.
252. Guo D, Sarkar J, Suino-Powell K, Xu Y, Matsumoto K, Jia Y, Yu S, Khare S, Haldar K, Rao MS *et al*: **Induction of nuclear translocation of constitutive androstane receptor by peroxisome proliferator-activated receptor alpha synthetic ligands in mouse liver.** *J Biol Chem* 2007, **282**(50):36766-36776.
253. Ren H, Aleksunes LM, Wood C, Vallanat B, George MH, Klaassen CD, Corton JC: **Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha--independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor.** *Toxicol Sci* 2010, **113**(1):45-59.
254. Wieneke N, Hirsch-Ernst KI, Kuna M, Kersten S, Puschel GP: **PPARalpha-dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: potential role in starvation adaptation.** *FEBS Lett* 2007, **581**(29):5617-5626.
255. Saito K, Kobayashi K, Mizuno Y, Fukuchi Y, Furihata T, Chiba K: **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonists induce constitutive androstane receptor (CAR) and cytochrome P450 2B in rat primary hepatocytes.** *Drug Metab Pharmacokinet* 2010, **25**(1):108-111.
256. Saito K, Kobayashi K, Mizuno Y, Furihata T, Chiba K: **Constitutive androstane/active receptor is a target of retinoic acid receptor in humans.** *Biochem Pharmacol* 2010, **80**(1):129-135.
257. Min G, Kim H, Bae Y, Petz L, Kemper JK: **Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits**

- ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators.** *J Biol Chem* 2002, **277**(37):34626-34633.
258. Handschin C, Meyer UA: **Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR.** *Arch Biochem Biophys* 2005, **433**(2):387-396.
259. Xiao L, Xie X, Zhai Y: **Functional crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in drug metabolism and lipid metabolism.** *Adv Drug Deliv Rev* 2010.
260. Wei P, Zhang J, Dowhan DH, Han Y, Moore DD: **Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response.** *Pharmacogenomics J* 2002, **2**(2):117-126.
261. Wortham M, Czerwinski M, He L, Parkinson A, Wan YJ: **Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(9):1700-1710.
262. Hines RN, Cashman JR, Philpot RM, Williams DE, Ziegler DM: **The mammalian flavin-containing monooxygenases: molecular characterization and regulation of expression.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **125**(1):1-6.
263. Waxman DJ, Azaroff L: **Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression.** *Biochem J* 1992, **281** ( Pt 3):577-592.
264. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW *et al*: **P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(1):1-42.
265. Nebert DW, Gonzalez FJ: **P450 genes: structure, evolution, and regulation.** *Annu Rev Biochem* 1987, **56**:945-993.
266. Adesnik M, Bar-Nun S, Maschio F, Zunich M, Lippman A, Bard E: **Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital.** *J Biol Chem* 1981, **256**(20):10340-10345.
267. Remmer H, Merker HJ: **Drug-Induced Changes in the Liver Endoplasmic Reticulum: Association with Drug-Metabolizing Enzymes.** *Science* 1963, **142**:1657-1658.
268. Remmer H, Schoene B, Fleischmann RA: **Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver.** *Drug Metab Dispos* 1973, **1**(1):224-230.

269. Conney AH, Davison C, Gastel R, Burns JJ: **Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.** *J Pharmacol Exp Ther* 1960, **130**:1-8.
270. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM *et al*: **Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands.** *J Biol Chem* 2000, **275**(20):15122-15127.
271. Kiyosawa N, Kwekel JC, Burgoon LD, Dere E, Williams KJ, Tashiro C, Chittim B, Zacharewski TR: **Species-specific regulation of PXR/CAR/ER-target genes in the mouse and rat liver elicited by o, p'-DDT.** *BMC Genomics* 2008, **9**:487.
272. Dean CE, Jr., Benjamin SA, Chubb LS, Tessari JD, Keefe TJ: **Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers.** *Toxicol Sci* 2002, **66**(1):54-61.
273. Honkakoski P, Palvimo JJ, Penttila L, Vepsalainen J, Auriola S: **Effects of triaryl phosphates on mouse and human nuclear receptors.** *Biochem Pharmacol* 2004, **67**(1):97-106.
274. Sakai H, Iwata H, Kim EY, Tsydenova O, Miyazaki N, Petrov EA, Batoev VB, Tanabe S: **Constitutive androstane receptor (CAR) as a potential sensing biomarker of persistent organic pollutants (POPs) in aquatic mammal: molecular characterization, expression level, and ligand profiling in Baikal seal (*Pusa sibirica*).** *Toxicol Sci* 2006, **94**(1):57-70.
275. Wyde ME, Bartolucci E, Ueda A, Zhang H, Yan B, Negishi M, You L: **The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**(2):474-481.
276. Kiyosawa N, Kwekel JC, Burgoon LD, Williams KJ, Tashiro C, Chittim B, Zacharewski TR: **o,p'-DDT elicits PXR/CAR-, not ER-, mediated responses in the immature ovariectomized rat liver.** *Toxicol Sci* 2008, **101**(2):350-363.
277. Blizard D, Sueyoshi T, Negishi M, Dehal SS, Kupfer D: **Mechanism of induction of cytochrome p450 enzymes by the proestrogenic endocrine disruptor pesticide-methoxychlor: interactions of methoxychlor metabolites with the constitutive androstane receptor system.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(6):781-785.
278. Wong H, Lehman-McKeeman LD, Grubb MF, Grossman SJ, Bhaskaran VM, Solon EG, Shen HS, Gerson RJ, Car BD, Zhao B *et al*: **Increased hepatobiliary clearance of unconjugated thyroxine determines DMP 904-induced alterations in thyroid hormone homeostasis in rats.** *Toxicol Sci* 2005, **84**(2):232-242.

279. Wyde ME, Kirwan SE, Zhang F, Laughter A, Hoffman HB, Bartolucci-Page E, Gaido KW, Yan B, You L: **Di-n-butyl phthalate activates constitutive androstane receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses.** *Toxicol Sci* 2005, **86**(2):281-290.
280. Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I: **In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat.** *Toxicology* 2005, **214**(1-2):113-122.
281. Slitt AL, Cherrington NJ, Dieter MZ, Aleksunes LM, Scheffer GL, Huang W, Moore DD, Klaassen CD: **trans-Stilbene oxide induces expression of genes involved in metabolism and transport in mouse liver via CAR and Nrf2 transcription factors.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**(5):1554-1563.
282. Slitt AL, Cherrington NJ, Fisher CD, Negishi M, Klaassen CD: **Induction of genes for metabolism and transport by trans-stilbene oxide in livers of Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto rats.** *Drug Metab Dispos* 2006, **34**(7):1190-1197.
283. Hernandez JP, Huang W, Chapman LM, Chua S, Moore DD, Baldwin WS: **The environmental estrogen, nonylphenol, activates the constitutive androstane receptor.** *Toxicol Sci* 2007, **98**(2):416-426.
284. Lee CH, Ito Y, Yanagiba Y, Yamanoshita O, Kim H, Zhang SY, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T: **Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR.** *Toxicology* 2007, **238**(2-3):147-156.
285. Yanagiba Y, Ito Y, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T: **Octachlorostyrene Induces Cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase and Sulfotransferase via the Aryl Hydrocarbon Receptor and Constitutive Androstane Receptor.** *Toxicol Sci* 2009.
286. Merrell MD, Augustine LM, Slitt AL, Cherrington NJ: **Induction of drug metabolism enzymes and transporters by oltipraz in rats.** *J Biochem Mol Toxicol* 2008, **22**(2):128-135.
287. Merrell MD, Jackson JP, Augustine LM, Fisher CD, Slitt AL, Maher JM, Huang W, Moore DD, Zhang Y, Klaassen CD *et al*: **The Nrf2 activator oltipraz also activates the constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2008, **36**(8):1716-1721.
288. Cheng X, Klaassen CD: **Critical role of PPAR-alpha in perfluorooctanoic acid- and perfluorodecanoic acid-induced downregulation of Oatp uptake transporters in mouse livers.** *Toxicol Sci* 2008, **106**(1):37-45.

289. Jackson JP, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA: **Phenytoin induction of the cyp2c37 gene is mediated by the constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2006, **34**(12):2003-2010.
290. Saussele T, Burk O, Bliedernicht JK, Klein K, Nussler A, Nussler N, Hengstler JG, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Selective induction of human hepatic cytochromes P450 2B6 and 3A4 by metamizole.** *Clin Pharmacol Ther* 2007, **82**(3):265-274.
291. Zhang J, Huang W, Chua SS, Wei P, Moore DD: **Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR.** *Science* 2002, **298**(5592):422-424.
292. Li L, Chen T, Stanton JD, Sueyoshi T, Negishi M, Wang H: **The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenyl-methylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2008, **74**(2):443-453.
293. Goetz AK, Bao W, Ren H, Schmid JE, Tully DB, Wood C, Rockett JC, Narotsky MG, Sun G, Lambert GR *et al*: **Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, **215**(3):274-284.
294. Peffer RC, Moggs JG, Pastoor T, Currie RA, Wright J, Milburn G, Waechter F, Rusyn I: **Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: role of the constitutive androstane receptor.** *Toxicol Sci* 2007, **99**(1):315-325.
295. Duret C, Daujat-Chavanieu M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Balaguer P, Fabre JM, Vilarem MJ, Maurel P, Gerbal-Chaloin S: **Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor.** *Mol Pharmacol* 2006, **70**(1):329-339.
296. Huang H, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, Teotico DG, Locker J, Kalpana GV, Mani S: **Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole.** *Oncogene* 2007, **26**(2):258-268.
297. Qatanani M, Wei P, Moore DD: **Alterations in the distribution and orexigenic effects of dexamethasone in CAR-null mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 2004, **78**(2):285-291.
298. Simonsson US, Lindell M, Raffalli-Mathieu F, Lannerbro A, Honkakoski P, Lang MA: **In vivo and mechanistic evidence of nuclear receptor CAR induction by artemisinin.** *Eur J Clin Invest* 2006, **36**(9):647-653.

299. Kobayashi K, Yamanaka Y, Iwazaki N, Nakajo I, Hosokawa M, Negishi M, Chiba K: **Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2005, **33**(7):924-929.
300. Bertrand-Thiebault C, Masson C, Siest G, Batt AM, Visvikis-Siest S: **Effect of HMGCoA reductase inhibitors on cytochrome P450 expression in endothelial cell line.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2007, **49**(5):306-315.
301. Monostory K, Pascussi JM, Szabo P, Temesvari M, Kohalmy K, Acimovic J, Kocjan D, Kuzman D, Wilzewski B, Bernhardt R *et al*: **Drug interaction potential of 2-((3,4-dichlorophenethyl)(propyl)amino)-1-(pyridin-3-yl)ethanol (LK-935), the novel nonstatin-type cholesterol-lowering agent.** *Drug Metab Dispos* 2009, **37**(2):375-385.
302. Huang W, Zhang J, Wei P, Schrader WT, Moore DD: **Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(10):2402-2408.
303. Shibayama Y, Ushinohama K, Ikeda R, Yoshikawa Y, Motoya T, Takeda Y, Yamada K: **Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in rats.** *Cancer Sci* 2006, **97**(11):1260-1266.
304. Chen X, Zhang J, Baker SM, Chen G: **Human constitutive androstane receptor mediated methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1).** *Toxicology* 2007, **231**(2-3):224-233.
305. Murray M, Fiala-Ber E, Sutton D: **Upregulation of cytochromes P450 2B in rat liver by orphenadrine.** *Br J Pharmacol* 2003, **139**(4):787-796.
306. Malaplate-Armand C, Ferrari L, Masson C, Visvikis-Siest S, Lambert H, Batt AM: **Down-regulation of astroglial CYP2C, glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor genes in response to cocaine in human U373 MG astrocytoma cells.** *Toxicol Lett* 2005, **159**(3):203-211.
307. Tolson AH, Li H, Eddington ND, Wang H: **Methadone Induces the Expression of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes Through the Activation of Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor.** *Drug Metab Dispos* 2009.
308. Li L, Hassan HE, Tolson AH, Ferguson SS, Eddington ND, Wang H: **Differential Activation of Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor by Buprenorphine in Primary Human Hepatocytes and HepG2 cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2010.
309. Kublbeck J, Jyrkkarinne J, Poso A, Turpeinen M, Sippl W, Honkakoski P, Windshugel B: **Discovery of substituted sulfonamides and thiazolidin-4-one derivatives as agonists**



- of human constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 2008, **76**(10):1288-1297.**
310. Li L, Stanton JD, Tolson AH, Luo Y, Wang H: **Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways.** *Pharm Res* 2009, **26**(4):872-882.
311. Huang W, Zhang J, Moore DD: **A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR.** *J Clin Invest* 2004, **113**(1):137-143.
312. Elferink RO: **Yin Zhi Huang and other plant-derived preparations: where herbal and molecular medicine meet.** *J Hepatol* 2004, **41**(4):691-693.
313. Chang TK: **Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines.** *AAPS J* 2009, **11**(3):590-601.
314. Ding X, Staudinger JL: **The ratio of constitutive androstane receptor to pregnane X receptor determines the activity of guggulsterone against the Cyp2b10 promoter.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **314**(1):120-127.
315. Li Y, Wang Q, Yao X: **Induction of CYP3A4 and MDR1 gene expression by baicalin, baicalein, chlorogenic acid, and ginsenoside Rf through constitutive androstane receptor- and pregnane X receptor-mediated pathways.** *Eur J Pharmacol* 2010, **640**(1-3):46-54.
316. Osabe M, Sugatani J, Fukuyama T, Ikushiro S, Ikari A, Miwa M: **Expression of hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 correlated with increased expression of the nuclear constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet.** *Drug Metab Dispos* 2008, **36**(2):294-302.
317. Zhang P, Noordine ML, Cherbuy C, Vaugelade P, Pascussi JM, Duee PH, Thomas M: **Different activation patterns of rat xenobiotic metabolism genes by two constituents of garlic.** *Carcinogenesis* 2006, **27**(10):2090-2095.
318. Li CC, Lii CK, Liu KL, Yang JJ, Chen HW: **DHA down-regulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes by attenuating CAR translocation.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, **225**(3):329-336.
319. Finn RD, Henderson CJ, Scott CL, Wolf CR: **Unsaturated fatty acid regulation of cytochrome P450 expression via a CAR-dependent pathway.** *Biochem J* 2009, **417**(1):43-54.

320. Yamada H, Yamaguchi T, Oguri K: **Suppression of the expression of the CYP2B1/2 gene by retinoic acids.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **277**(1):66-71.
321. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, Tsuruoka N, Kiso Y, Sueyoshi T, Negishi M, Misaka T *et al*: **Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR).** *J Agric Food Chem* 2010, **58**(4):2168-2173.
322. Yu LJ, Matias J, Scudiero DA, Hite KM, Monks A, Sausville EA, Waxman DJ: **P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(3):304-312.
323. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA: **Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**(3):638-646.
324. Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, Lehmann JM, Negishi M: **Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital.** *Mol Pharmacol* 2002, **61**(1):1-6.
325. Handschin C, Meyer UA: **Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors.** *Pharmacol Rev* 2003, **55**(4):649-673.
326. Di YM, Chow VD, Yang LP, Zhou SF: **Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6.** *Curr Drug Metab* 2009, **10**(7):754-780.
327. Wang H, Faucette SR, Gilbert D, Jolley SL, Sueyoshi T, Negishi M, LeCluyse EL: **Glucocorticoid receptor enhancement of pregnane X receptor-mediated CYP2B6 regulation in primary human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2003, **31**(5):620-630.
328. Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA: **Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **308**(2):495-501.
329. Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA: **Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**(2):316-324.
330. Goodwin B, Hodgson E, D'Costa DJ, Robertson GR, Liddle C: **Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**(2):359-365.
331. Konno Y, Kamino H, Moore R, Lih F, Tomer KB, Zeldin DC, Goldstein JA, Negishi M: **The nuclear receptors constitutive active/androstane receptor and pregnane x**

- receptor activate the Cyp2c55 gene in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2010, **38**(7):1177-1182.
332. Xu C, Wang X, Staudinger JL: **Regulation of tissue-specific carboxylesterase expression by pregnane x receptor and constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2009, **37**(7):1539-1547.
333. Liu MJ, Takahashi Y, Wada T, He J, Gao J, Tian Y, Li S, Xie W: **The Aldo-keto reductase Akr1b7 gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors PXR and CAR.** *Mol Pharmacol* 2009.
334. Knight TR, Choudhuri S, Klaassen CD: **Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers.** *Toxicol Sci* 2008, **106**(2):329-338.
335. Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, Zelcer N, Adachi M, Strom S, Evans RM *et al*: **Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice.** *J Biol Chem* 2004, **279**(21):22250-22257.
336. Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T: **The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR.** *Hepatology* 2001, **33**(5):1232-1238.
337. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD: **Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver.** *Drug Metab Dispos* 2005, **33**(7):956-962.
338. Guo GL, Choudhuri S, Klaassen CD: **Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **300**(1):206-212.
339. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O: **Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2006, **34**(10):1756-1763.
340. Rezen T, Rozman D, Pascussi JM, Monostory K: **Interplay between cholesterol and drug metabolism.** *Biochim Biophys Acta* 2010.
341. Miller DD: **Effect of phenytoin on plasma clozapine concentrations in two patients.** *J Clin Psychiatry* 1991, **52**(1):23-25.

342. Oscarson M, Zanger UM, Rifki OF, Klein K, Eichelbaum M, Meyer UA: **Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine.** *Clin Pharmacol Ther* 2006, **80**(5):440-456.
343. Tomaszewski P, Kubiak-Tomaszewska G, Pachecka J: **Cytochrome P450 polymorphism--molecular, metabolic, and pharmacogenetic aspects. II. Participation of CYP isoenzymes in the metabolism of endogenous substances and drugs.** *Acta Pol Pharm* 2008, **65**(3):307-318.
344. Nemoto N, Sakurai J: **Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes.** *Arch Biochem Biophys* 1995, **319**(1):286-292.
345. Kohalmy K, Tamasi V, Kobori L, Sarvary E, Pascussi JM, Porrogi P, Rozman D, Prough RA, Meyer UA, Monostory K: **Dehydroepiandrosterone induces human CYP2B6 through the constitutive androstane receptor.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(9):1495-1501.
346. Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, Negishi M: **Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity.** *J Biol Chem* 2006, **281**(24):16625-16631.
347. Zhang J, Huang W, Qatanani M, Evans RM, Moore DD: **The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity.** *J Biol Chem* 2004, **279**(47):49517-49522.
348. Fujita A, Furutama D, Tanaka T, Sakai R, Koyama A, Hanafusa T, Mitsuhashi T, Ohsawa N: **In vivo activation of the constitutive androstane receptor beta (CARbeta) by treatment with dehydroepiandrosterone (DHEA) or DHEA sulfate (DHEA-S).** *FEBS Lett* 2002, **532**(3):373-378.
349. Jyrkkarinne J, Makinen J, Gynther J, Savolainen H, Poso A, Honkakoski P: **Molecular determinants of steroid inhibition for the mouse constitutive androstane receptor.** *J Med Chem* 2003, **46**(22):4687-4695.
350. Makinen J, Reinisalo M, Niemi K, Viitala P, Jyrkkarinne J, Chung H, Pelkonen O, Honkakoski P: **Dual action of oestrogens on the mouse constitutive androstane receptor.** *Biochem J* 2003, **376**(Pt 2):465-472.
351. McClain RM, Levin AA, Posch R, Downing JC: **The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, **99**(2):216-228.

352. Klaassen CD, Hood AM: **Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular cell proliferation and thyroid hormone metabolism.** *Toxicol Pathol* 2001, **29**(1):34-40.
353. Barter RA, Klaassen CD: **Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **128**(1):9-17.
354. Yuksel A, Kartal A, Cenani A, Yalcin E: **Serum thyroid hormones and pituitary response to thyrotropin-releasing hormone in epileptic children receiving anti-epileptic medication.** *Acta Paediatr Jpn* 1993, **35**(2):108-112.
355. Eiris JM, Lojo S, Del Rio MC, Novo I, Bravo M, Pavon P, Castro-Gago M: **Effects of long-term treatment with antiepileptic drugs on serum lipid levels in children with epilepsy.** *Neurology* 1995, **45**(6):1155-1157.
356. Eiris J, Novo-Rodriguez MI, Del Rio M, Meseguer P, Del Rio MC, Castro-Gago M: **The effects on lipid and apolipoprotein serum levels of long-term carbamazepine, valproic acid and phenobarbital therapy in children with epilepsy.** *Epilepsy Res* 2000, **41**(1):1-7.
357. Tanaka K, Kodama S, Yokoyama S, Komatsu M, Konishi H, Momota K, Matsuo T: **Thyroid function in children with long-term anticonvulsant treatment.** *Pediatr Neurosci* 1987, **13**(2):90-94.
358. Hiasa Y, Kitahori Y, Ohshima M, Fujita T, Yuasa T, Konishi N, Miyashiro A: **Promoting effects of phenobarbital and barbital on development of thyroid tumors in rats treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.** *Carcinogenesis* 1982, **3**(10):1187-1190.
359. Surks MI, Sievert R: **Drugs and thyroid function.** *N Engl J Med* 1995, **333**(25):1688-1694.
360. Alexander EK, Marqusee E, Lawrence J, Jarolim P, Fischer GA, Larsen PR: **Timing and magnitude of increases in levothyroxine requirements during pregnancy in women with hypothyroidism.** *N Engl J Med* 2004, **351**(3):241-249.
361. Qatanani M, Zhang J, Moore DD: **Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism.** *Endocrinology* 2005, **146**(3):995-1002.
362. Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A, Sauer PJ: **Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants.** *Pediatr Res* 1994, **36**(4):468-473.

363. Hagmar L, Rylander L, Dyremark E, Klasson-Wehler E, Erfurth EM: **Plasma concentrations of persistent organochlorines in relation to thyrotropin and thyroid hormone levels in women.** *Int Arch Occup Environ Health* 2001, **74**(3):184-188.
364. Wong KT, Ahuja AT: **Ultrasound of thyroid cancer.** *Cancer Imaging* 2005, **5**:157-166.
365. Szabo DT, Richardson VM, Ross DG, Diliberto JJ, Kodavanti PR, Birnbaum LS: **Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups.** *Toxicol Sci* 2009, **107**(1):27-39.
366. Tien ES, Matsui K, Moore R, Negishi M: **The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver.** *J Pharmacol Exp Ther* 2007, **320**(1):307-313.
367. Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT: **The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction.** *J Biol Chem* 2004, **279**(19):19832-19838.
368. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK *et al*: **Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.** *Nature* 2001, **413**(6852):131-138.
369. Shiraki T, Sakai N, Kanaya E, Jingami H: **Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. A possible link between xenobiotic response and nutritional state.** *J Biol Chem* 2003, **278**(13):11344-11350.
370. Ooe H, Kon J, Oshima H, Mitaka T: **Thyroid Hormone Is Necessary for Expression of Constitutive Androstane Receptor in Rat Hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2009.
371. Yaffe SJ, Catz CS, Stern L, Levy G: **The use of phenobarbital in neonatal jaundice.** *Birth Defects Orig Artic Ser* 1970, **6**(2):37-45.
372. Yaffe SJ, Dorn LD: **Effects of prenatal treatment with phenobarbital.** *Dev Pharmacol Ther* 1990, **15**(3-4):215-223.
373. Huang W, Zhang J, Chua SS, Qatanani M, Han Y, Granata R, Moore DD: **Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(7):4156-4161.
374. Masuyama H, Nakatsukasa H, Hiramatsu Y: **Effect of oncostatin M on uridine diphosphate-5'-glucuronosyltransferase 1A1 through cross talk with constitutive androstane receptor.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(4):745-753.

375. Fraser DJ, Zumsteg A, Meyer UA: **Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene.** *J Biol Chem* 2003, **278**(41):39392-39401.
376. Kawase A, Yoshida I, Tsunokuni Y, Iwaki M: **Decreased PXR and CAR inhibit transporter and CYP mRNA Levels in the liver and intestine of mice with collagen-induced arthritis.** *Xenobiotica* 2007, **37**(4):366-374.
377. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ: **Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **274**(3):707-713.
378. Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR: **Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293**(1):145-149.
379. Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Grunfeld C, Feingold KR: **Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **287**(4):E731-738.
380. Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ, Pascussi JM: **Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance.** *Hepatology* 2004, **40**(4):951-960.
381. Kawase A, Tsunokuni Y, Iwaki M: **Effects of alterations in CAR on bilirubin detoxification in mouse collagen-induced arthritis.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**(2):256-261.
382. Fang C, Yoon S, Tindberg N, Jarvelainen HA, Lindros KO, Ingelman-Sundberg M: **Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of nuclear receptors after acute endotoxin exposure.** *Biochem Pharmacol* 2004, **67**(7):1389-1397.
383. Fradette C, du Souich P: **Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia.** *Br J Pharmacol* 2003, **140**(6):1146-1154.
384. Maglich JM, Lobe DC, Moore JT: **The nuclear receptor CAR (NR113) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress.** *J Lipid Res* 2009, **50**(3):439-445.

385. Hasmall SC, Roberts RA: **The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics.** *Pharmacol Ther* 1999, **82**(1):63-70.
386. Whysner J, Ross PM, Williams GM: **Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion.** *Pharmacol Ther* 1996, **71**(1-2):153-191.
387. Manenti G, Dragani TA, Della Porta G: **Effects of phenobarbital and 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene on differentiated functions in mouse liver.** *Chem Biol Interact* 1987, **64**(1-2):83-92.
388. Locker J, Tian J, Carver R, Concas D, Cossu C, Ledda-Columbano GM, Columbano A: **A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia.** *Hepatology* 2003, **38**(2):314-325.
389. Blanco-Bose WE, Murphy MJ, Ehninger A, Offner S, Dubey C, Huang W, Moore DD, Trump A: **C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia.** *Hepatology* 2008, **48**(4):1302-1311.
390. Ledda-Columbano GM, Perra A, Loi R, Shinozuka H, Columbano A: **Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas.** *Cancer Res* 2000, **60**(3):603-609.
391. Diwan BA, Lubet RA, Ward JM, Hrabie JA, Rice JM: **Tumor-promoting and hepatocarcinogenic effects of 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) in DBA/2Ncr and C57BL/6Ncr mice and an apparent promoting effect on nasal cavity tumors but not on hepatocellular tumors in F344/NCr rats initiated with N-nitrosodiethylamine.** *Carcinogenesis* 1992, **13**(10):1893-1901.
392. Smith G, Henderson CJ, Parker MG, White R, Bars RG, Wolf CR: **1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression.** *Biochem J* 1993, **289** ( Pt 3):807-813.
393. Yamamoto Y, Moore R, Goldsworthy TL, Negishi M, Maronpot RR: **The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice.** *Cancer Res* 2004, **64**(20):7197-7200.
394. Phillips JM, Yamamoto Y, Negishi M, Maronpot RR, Goodman JI: **Orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor-mediated alterations in DNA methylation during phenobarbital promotion of liver tumorigenesis.** *Toxicol Sci* 2007, **96**(1):72-82.



395. Phillips JM, Burgoon LD, Goodman JI: **The Constitutive Active/Androstane Receptor (CAR) Facilitates Unique Phenobarbital (PB)-Induced Expression Changes of Genes Involved in Key Pathways in Precancerous Liver and Liver Tumors.** *Toxicol Sci* 2009.
396. Phillips JM, Goodman JI: **Multiple genes exhibit phenobarbital-induced constitutive active/androstane receptor-mediated DNA methylation changes during liver tumorigenesis and in liver tumors.** *Toxicol Sci* 2009, **108**(2):273-289.
397. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Pibiri M, Cossu C, Menegazzi M, Moore DD, Huang W, Tian J, Locker J: **Gadd45beta is induced through a CAR-dependent, TNF-independent pathway in murine liver hyperplasia.** *Hepatology* 2005, **42**(5):1118-1126.
398. Huang W, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G, Moore DD: **Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(6):1646-1653.
399. Osabe M, Sugatani J, Takemura A, Yamazaki Y, Ikari A, Kitamura N, Negishi M, Miwa M: **Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 is associated with cell proliferation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **369**(4):1027-1033.
400. Vazquez JJ, Marigil MA: **Liver-cell adenoma in an epileptic man on barbiturates.** *Histol Histopathol* 1989, **4**(3):301-303.
401. Ross J, Plummer SM, Rode A, Scheer N, Bower CC, Vogel O, Henderson CJ, Wolf CR, Elcombe CR: **Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo.** *Toxicol Sci* 2010, **116**(2):452-466.
402. Rangarajan A, Weinberg RA: **Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(12):952-959.
403. Baskin-Bey ES, Huang W, Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Braley K, Craig RW, Moore DD, Gores GJ: **Constitutive androstane receptor (CAR) ligand, TCPOBOP, attenuates Fas-induced murine liver injury by altering Bcl-2 proteins.** *Hepatology* 2006, **44**(1):252-262.
404. Costa RH, Kalinichenko VV, Tan Y, Wang IC: **The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation.** *Hepatology* 2005, **42**(5):1004-1008.
405. Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A: **Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors.** *Drug Metab Dispos* 2003, **31**(5):523-527.

406. Stedman CA, Liddle C, Coulter SA, Sonoda J, Alvarez JG, Moore DD, Evans RM, Downes M: **Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(6):2063-2068.
407. Beilke LD, Aleksunes LM, Olson ER, Besselsen DG, Klaassen CD, Dvorak K, Cherrington NJ: **Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice.** *Toxicol Lett* 2009, **188**(1):38-44.
408. Saini SP, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, Ren S, Moore DD, Evans RM, Xie W: **A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**(2):292-300.
409. Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, Zatloukal K, Denk H, Trauner M: **CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice.** *Hepatology* 2005, **42**(2):420-430.
410. Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB, Jr., Kliewer SA, Gonzalez FJ, Sinal CJ: **Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity.** *J Biol Chem* 2003, **278**(46):45062-45071.
411. Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de Pedro N, Royo I, Blevins RA, Pelaez F *et al*: **Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3.** *J Biol Chem* 2003, **278**(51):51085-51090.
412. Beilke LD, Aleksunes LM, Holland RD, Besselsen DG, Beger RD, Klaassen CD, Cherrington NJ: **Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice.** *Drug Metab Dispos* 2009, **37**(5):1035-1045.
413. Xie W, Yeuh MF, Radominska-Pandya A, Saini SP, Negishi Y, Bottroff BS, Cabrera GY, Tukey RH, Evans RM: **Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(7):4150-4155.
414. Sugatani J, Nishitani S, Yamakawa K, Yoshinari K, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M: **Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1.** *Mol Pharmacol* 2005, **67**(3):845-855.
415. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ: **The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp.** *Gastroenterology* 2001, **121**(1):140-147.

416. Aynaci FM, Orhan F, Orem A, Yildirmis S, Gedik Y: **Effect of Antiepileptic drugs on plasma lipoprotein (a) and other lipid levels in childhood.** *J Child Neurol* 2001, **16**(5):367-369.
417. Berlit P, Krause KH, Heuck CC, Schellenberg B: **Serum lipids and anticonvulsants.** *Acta Neurol Scand* 1982, **66**(3):328-334.
418. Calandre EP, Rodriguez-Lopez C, Blazquez A, Cano D: **Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins A and B in epileptic patients treated with valproic acid, carbamazepine or phenobarbital.** *Acta Neurol Scand* 1991, **83**(4):250-253.
419. Franzoni E, Govoni M, D'Addato S, Gualandi S, Sangiorgi Z, Descovich GC, Salvioli GP: **Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides in children receiving antiepileptic drugs.** *Epilepsia* 1992, **33**(5):932-935.
420. Luoma PV, Sotaniemi EA, Pelkonen RO, Arranto A, Ehnholm C: **Plasma high-density lipoproteins and hepatic microsomal enzyme induction. Relation to histological changes in the liver.** *Eur J Clin Pharmacol* 1982, **23**(3):275-282.
421. Luoma PV, Sotaniemi EA, Pelkonen RO, Ehnholm C: **High-density lipoproteins and hepatic microsomal enzyme induction in alcohol consumers.** *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982, **37**(1):91-96.
422. Heldenberg D, Harel S, Holtzman M, Levtow O, Tamir I: **The effect of chronic anticonvulsant therapy on serum lipids and lipoproteins in epileptic children.** *Neurology* 1983, **33**(4):510-513.
423. Verrotti A, Domizio S, Angelozzi B, Sabatino G, Morgese G, Chiarelli F: **Changes in serum lipids and lipoproteins in epileptic children treated with anticonvulsants.** *J Paediatr Child Health* 1997, **33**(3):242-245.
424. Durrington PN, Roberts CJ, Jackson L, Branch RA, Hartog M: **Effect of phenobarbitone on plasma lipids in normal subjects.** *Clin Sci Mol Med* 1976, **50**(5):349-353.
425. Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, Kliewer SA: **Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor.** *Mol Pharmacol* 2001, **60**(3):427-431.
426. Tamasi V, Juvan P, Beer M, Rozman D, Meyer UA: **Transcriptional activation of PPARalpha by phenobarbital in the absence of CAR and PXR.** *Mol Pharm* 2009, **6**(5):1573-1581.
427. Kobayashi K, Yamagami S, Higuchi T, Hosokawa M, Chiba K: **Key structural features of ligands for activation of human pregnane X receptor.** *Drug Metab Dispos* 2004, **32**(4):468-472.

428. Lahtela JT, Arranto AJ, Sotaniemi EA: **Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects.** *Diabetes* 1985, **34**(9):911-916.
429. Argaud D, Halimi S, Catelloni F, Leverve XM: **Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital.** *Biochem J* 1991, **280** (Pt 3):663-669.
430. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y: **Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(18):7931-7940.
431. Venkatesan N, Davidson MB, Simsolo RB, Kern PA: **Phenobarbital treatment enhances insulin-mediated glucose metabolism and improves lipid metabolism in the diabetic rat.** *Metabolism* 1994, **43**(3):348-356.
432. Hall IH, Patrick MA, Maguire JH: **Hypolipidemic activity in rodents of phenobarbital and related derivatives.** *Arch Pharm (Weinheim)* 1990, **323**(9):579-586.
433. Kiyosawa N, Tanaka K, Hirao J, Ito K, Niino N, Sakuma K, Kanbori M, Yamoto T, Manabe S, Matsunuma N: **Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis.** *Arch Toxicol* 2004, **78**(8):435-442.
434. Yamamoto Y, Kawamoto T, Negishi M: **The role of the nuclear receptor CAR as a coordinate regulator of hepatic gene expression in defense against chemical toxicity.** *Arch Biochem Biophys* 2003, **409**(1):207-211.
435. Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, Stevens RD, Ilkayeva O, Newgard CB, Chan L *et al*: **Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(44):18831-18836.
436. Baskin-Bey ES, Anan A, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ: **Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP, attenuates steatohepatitis in the methionine choline-deficient diet-fed mouse.** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(42):5635-5641.
437. Roth A, Looser R, Kaufmann M, Blattler SM, Rencurel F, Huang W, Moore DD, Meyer UA: **Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression.** *Mol Pharmacol* 2008, **73**(4):1282-1289.
438. Roth A, Looser R, Kaufmann M, Meyer UA: **Sterol regulatory element binding protein 1 interacts with pregnane X receptor and constitutive androstane receptor and represses their target genes.** *Pharmacogenet Genomics* 2008, **18**(4):325-337.

439. Shah A, Rader DJ, Millar JS: **The effect of PPAR-alpha agonism on apolipoprotein metabolism in humans.** *Atherosclerosis* 2010, **210**(1):35-40.
440. Yoon M: **The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions.** *Pharmacol Res* 2009, **60**(3):151-159.
441. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC, Jr., Kelly DP: **Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway.** *Cell Metab* 2006, **4**(3):199-210.
442. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A: **Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism.** *Prog Lipid Res* 2006, **45**(3):237-249.
443. Martin PG, Guillou H, Lasserre F, Dejean S, Lan A, Pascussi JM, Sancristobal M, Legrand P, Besse P, Pineau T: **Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study.** *Hepatology* 2007, **45**(3):767-777.
444. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Pibiri M, Concas D, Reddy JK, Rao MS: **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mice show enhanced hepatocyte proliferation in response to the hepatomitogen 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene, a ligand of constitutive androstane receptor.** *Hepatology* 2001, **34**(2):262-266.
445. Willson TM, Kliewer SA: **PXR, CAR and drug metabolism.** *Nat Rev Drug Discov* 2002, **1**(4):259-266.
446. Qatanani M, Moore DD: **CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease.** *Curr Drug Metab* 2005, **6**(4):329-339.
447. Dong B, Qatanani M, Moore DD: **Constitutive androstane receptor mediates the induction of drug metabolism in mouse models of type 1 diabetes.** *Hepatology* 2009.
448. Saini SP, Mu Y, Gong H, Toma D, Uppal H, Ren S, Li S, Poloyac SM, Xie W: **Dual role of orphan nuclear receptor pregnane X receptor in bilirubin detoxification in mice.** *Hepatology* 2005, **41**(3):497-505.
449. Huang J, Bathena SP, Tong J, Roth M, Hagenbuch B, Alnouti Y: **Kinetic analysis of bile acid sulfation by stably expressed human sulfotransferase 2A1 (SULT2A1).** *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **40**(3):184-194.
450. Miyata M, Watase H, Hori W, Shimada M, Nagata K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y: **Role for enhanced faecal excretion of bile acid in hydroxysteroid sulfotransferase-mediated**

- protection against lithocholic acid-induced liver toxicity.** *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 2006, **36**(7):631-644.
451. Rezen T, Tamasi V, Lovgren Sandblom A, Bjorkhem I, Meyer UA, Rozman D: **Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse liver.** *BMC genomics* 2009, **10**(1):384.
452. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH: **Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **110**(5):671-680.
453. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH: **Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(25):16237-16242.
454. van der Velde AE, Vrans CL, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK: **Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice.** *Gastroenterology* 2007, **133**(3):967-975.
455. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ: **Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo.** *Circulation* 2006, **113**(1):90-97.
456. Brown MS, Goldstein JL: **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** *Science* 1986, **232**(4746):34-47.
457. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL: **Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia.** *Hum Mutat* 1992, **1**(6):445-466.
458. Watanabe Y, Ito T, Shiomi M: **The effect of selective breeding on the development of coronary atherosclerosis in WHHL rabbits. An animal model for familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1985, **56**(1):71-79.
459. Scanu AM, Khalil A, Neven L, Tidore M, Dawson G, Pfaffinger D, Jackson E, Carey KD, McGill HC, Fless GM: **Genetically determined hypercholesterolemia in a rhesus monkey family due to a deficiency of the LDL receptor.** *J Lipid Res* 1988, **29**(12):1671-1681.
460. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J: **Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.** *J Clin Invest* 1993, **92**(2):883-893.

461. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS: **The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(10):4431-4435.
462. Knowles JW, Maeda N: **Genetic modifiers of atherosclerosis in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**(11):2336-2345.
463. Mahley RW: **Development of accelerated atherosclerosis. Concepts derived from cell biology and animal model studies.** *Arch Pathol Lab Med* 1983, **107**(8):393-399.
464. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R: **ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.** *Arterioscler Thromb* 1994, **14**(1):133-140.
465. Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM, 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefer AM, Lefer DJ: **Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice.** *Circulation* 2001, **103**(21):2598-2603.
466. Brown SA, Via DP, Gotto AM, Jr., Bradley WA, Gianturco SH: **Apolipoprotein E-mediated binding of hypertriglyceridemic very low density lipoproteins to isolated low density lipoprotein receptors detected by ligand blotting.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **139**(1):333-340.
467. Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T: **Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene.** *J Biol Chem* 1994, **269**(3):2173-2182.
468. Mulhaupt HA, Gafvels ME, Kariko K, Jin H, Arenas-Elliot C, Goldman BI, Strauss JF, 3rd, Angelin B, Warhol MJ, McCrae KR: **Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry.** *Am J Pathol* 1996, **148**(6):1985-1997.
469. Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T: **Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(19):9252-9256.
470. Oka K, Ishimura-Oka K, Chu MJ, Sullivan M, Krushkal J, Li WH, Chan L: **Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor.** *Eur J Biochem* 1994, **224**(3):975-982.

471. Jokinen EV, Landschulz KT, Wyne KL, Ho YK, Frykman PK, Hobbs HH: **Regulation of the very low density lipoprotein receptor by thyroid hormone in rat skeletal muscle.** *J Biol Chem* 1994, **269**(42):26411-26418.
472. Wyne KL, Pathak K, Seabra MC, Hobbs HH: **Expression of the VLDL receptor in endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, **16**(3):407-415.
473. Takahashi M, Takahashi S, Shimpo M, Naito A, Ogata Y, Kobayashi E, Ikeda U, Shimada K: **beta-very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells.** *Atherosclerosis* 2002, **162**(2):307-313.
474. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT: **The very low density lipoprotein (VLDL) receptor--a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues.** *Mol Cell Biochem* 2003, **248**(1-2):121-127.
475. Suzuki J, Takahashi S, Oida K, Shimada A, Kohno M, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T: **Lipid accumulation and foam cell formation in Chinese hamster ovary cells overexpressing very low density lipoprotein receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **206**(3):835-842.
476. Battey FD, Gafvels ME, FitzGerald DJ, Argraves WS, Chappell DA, Strauss JF, 3rd, Strickland DK: **The 39-kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem* 1994, **269**(37):23268-23273.
477. Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U: **VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro.** *J Lipid Res* 1996, **37**(8):1733-1742.
478. Argraves KM, Kozarsky KF, Fallon JT, Harpel PC, Strickland DK: **The atherogenic lipoprotein Lp(a) is internalized and degraded in a process mediated by the VLDL receptor.** *J Clin Invest* 1997, **100**(9):2170-2181.
479. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T: **Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase.** *J Biol Chem* 1995, **270**(26):15747-15754.
480. Kobayashi K, Oka K, Forte T, Ishida B, Teng B, Ishimura-Oka K, Nakamuta M, Chan L: **Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem* 1996, **271**(12):6852-6860.



481. Takahashi S, Oida K, Ookubo M, Suzuki J, Kohno M, Murase T, Yamamoto T, Nakai T: **Very low density lipoprotein receptor binds apolipoprotein E2/2 as well as apolipoprotein E3/3.** *FEBS Lett* 1996, **386**(2-3):197-200.
482. van Dijk KW, van Vlijmen BJ, van der Zee A, van't Hof B, van der Boom H, Kobayashi K, Chan L, Havekes LM, Hofker MH: **Reversal of hypercholesterolemia in apolipoprotein E2 and apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice by adenovirus-mediated gene transfer of the VLDL receptor.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**(1):7-12.
483. Tacke PJ, Beer FD, Vark LC, Havekes LM, Hofker MH, Willems Van Dijk K: **Very-low-density lipoprotein binding to the apolipoprotein E receptor 2 is enhanced by lipoprotein lipase, and does not require apolipoprotein E.** *Biochem J* 2000, **347**(Pt 2):357-361.
484. Oka K, Pastore L, Kim IH, Merched A, Nomura S, Lee HJ, Merched-Sauvage M, Arden-Riley C, Lee B, Finegold M *et al*: **Long-term stable correction of low-density lipoprotein receptor-deficient mice with a helper-dependent adenoviral vector expressing the very low-density lipoprotein receptor.** *Circulation* 2001, **103**(9):1274-1281.
485. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF, 3rd, Wilson JM: **Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene.** *Nat Genet* 1996, **13**(1):54-62.
486. Yamamoto T, Hoshino A, Takahashi S, Kawarabayasi Y, Iijima H, Sakai J: **The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE.** *Ann N Y Acad Sci* 1995, **748**:217-224; discussion 224-215.
487. Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gafvels M, Kozarsky KF, Chappell DA, Strauss JF, 3rd, Strickland DK: **The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes.** *J Biol Chem* 1995, **270**(44):26550-26557.
488. Obunike JC, Lutz EP, Li Z, Paka L, Katopodis T, Strickland DK, Kozarsky KF, Pillarisetti S, Goldberg IJ: **Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem* 2001, **276**(12):8934-8941.
489. Chen SJ, Rader DJ, Tazelaar J, Kawashiri M, Gao G, Wilson JM: **Prolonged correction of hyperlipidemia in mice with familial hypercholesterolemia using an adeno-associated viral vector expressing very-low-density lipoprotein receptor.** *Mol Ther* 2000, **2**(3):256-261.

490. Jong MC, van Dijk KW, Dahlmans VE, Van der Boom H, Kobayashi K, Oka K, Siest G, Chan L, Hofker MH, Havekes LM: **Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor.** *Biochem J* 1999, **338 ( Pt 2)**:281-287.
491. MacDougall ED, Kramer F, Polinsky P, Barnhart S, Askari B, Johansson F, Varon R, Rosenfeld ME, Oka K, Chan L *et al*: **Aggressive very low-density lipoprotein (VLDL) and LDL lowering by gene transfer of the VLDL receptor combined with a low-fat diet regimen induces regression and reduces macrophage content in advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice.** *Am J Pathol* 2006, **168(6)**:2064-2073.
492. Fruchart JC, Brewer HB, Jr., Leitersdorf E: **Consensus for the use of fibrates in the treatment of dyslipoproteinemia and coronary heart disease. Fibrate Consensus Group.** *Am J Cardiol* 1998, **81(7)**:912-917.
493. Remick J, Weintraub H, Setton R, Offenbacher J, Fisher E, Schwartzbard A: **Fibrate therapy: an update.** *Cardiol Rev* 2008, **16(3)**:129-141.
494. Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A: **Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders.** *Prog Lipid Res* 2010, **49(2)**:171-185.
495. Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, Wang S, Krueger JA, Evans MJ: **Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> mice.** *J Lipid Res* 2009, **50(6)**:1090-1100.
496. Parikh N, Frishman WH: **Liver x receptors: a potential therapeutic target for modulating the atherosclerotic process.** *Cardiol Rev* 2010, **18(6)**:269-274.
497. Zhu Y, Li Y: **Liver X receptors as potential therapeutic targets in atherosclerosis.** *Clin Invest Med* 2009, **32(5)**:E383-394.
498. Fievet C, Staels B: **Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77(8)**:1316-1327.
499. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, Kliewer SA: **International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor.** *Pharmacol Rev* 2006, **58(4)**:742-759.

500. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD: **The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism.** *Nature* 2000, **407**(6806):920-923.

# ANNEXES

**Annexe 1:** Classification des récepteurs nucléaires [40].

NOMS	NOMENCLATURE	LIGANDS ENDOGENES	LIGANDS EXOGENES
<b>NR1</b>			
<b>TR <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></b>	NR1A1 et 2	Hormones thyroïdiennes	
<b>RAR <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> et <math>\gamma</math></b>	NR1B1, 2 et 3	Acide trans-rétinoïque	AM 580
<b>PPAR <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> et <math>\gamma</math></b>	NR1C1, 2 et 3	Acides gras, leucotriène B4, prostaglandine J2	Fibrates ( $\alpha$ ) Thiazolidinediones ( $\gamma$ )
<b>Rev-erb <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></b>	NR1D1 et 2	Orphelins	
<b>ROR <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> et <math>\gamma</math></b>	NR1F1, 2 et 3	Cholestérol et sulfate de cholestérol ( $\alpha$ ), acide rétinoïque ( $\beta$ , orphelin ( $\gamma$ ))	T0901317
<b>LXR <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></b>	NR1H3 et 2	Oxystérols	T0901317 GW3965
<b>FXR <math>\alpha</math> (et <math>\beta</math>)</b>	NR1H4 (et 5)	Acides biliaires ( $\alpha$ ), lanostérol	Fexaramine ( $\alpha$ )
<b>VDR</b>	NR1I1	Vitamine D et 1,25 dihydroxyvitamine D3, acide lithocholique	
<b>PXR</b>	NR1I2		16 $\alpha$ cyanoprégénolone, phénobarbital (non spécifique)
<b>CAR</b>	NR1I3		CITCO, TCPOBOP, phénobarbital, androstanol et androstérol
<b>NR2</b>			
<b>HNF4 <math>\alpha</math> et <math>\gamma</math></b>	NR2A1 et 2	Orphelin	
<b>RXR <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> et <math>\gamma</math></b>	NR2B1, 2 et 3	Acide 9-cis rétinoïque	LGD 100268
<b>TR2 et 4</b>	NR2C1 et 2	Orphelin	

<b>TLL</b>	NR2E2	Orphelin	
<b>PNR</b>	NR2E3	Orphelin	
<b>COUP-TFI</b>	NR2F1	Orphelin	
<b>COUP-TFII</b>	NR2F2	Orphelin	
<b>EAR2</b>	NR2F6	Orphelin	
<b>NR3</b>			
<b>ER <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></b>	NR3A1 et 2	17 $\beta$ œstradiol	Tamoxifène, raloxifène
<b>ERR <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> et <math>\gamma</math></b>	NR3B1, 2 et 3	Orphelin ( $\alpha$ )	DES et 4-OH tamoxifène ( $\beta$ et $\gamma$ )
<b>GR</b>	NR3C1	Cortisol	Déxaméthasone, RU486
<b>MR</b>	NR3C2	Aldostérone	Spiroinolactone
<b>PR</b>	NR3C3	Progestérone	Acétate de médroxyprogestérone, RU486
<b>AR</b>	NR3C4	Testostérone	Flutamide
<b>NR4</b>			
<b>NGFI-B</b>	NR4A1	Orphelin	
<b>NURR1</b>	NR4A2	Orphelin	
<b>NOR1</b>	NR4A3	Orphelin	
<b>NR5</b>			
<b>SF1</b>	NR5A1	Orphelin	
<b>LRH-1</b>	NR5A2	Orphelin	
<b>NR6</b>			
<b>GCNF</b>	NR6A1	Orphelin	
<b>DAX-1</b>	NR0B1	Orphelin	
<b>SHP</b>	NR0B2	Orphelin	

Annexe 2 : « Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice ».

## Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice

David Masson,<sup>\*†</sup> Mohamed Qatanani,<sup>§</sup> Anne Laure Sberna,<sup>\*†</sup> Rui Xiao,<sup>§</sup> Jean Paul Pais de Barros,<sup>\*†</sup> Jacques Grober,<sup>\*†</sup> Valerie Deckert,<sup>\*†</sup> Anne Athias,<sup>\*†</sup> Philippe Gambert,<sup>\*†</sup> Laurent Lagrost,<sup>\*†</sup> David D. Moore,<sup>§</sup> and Mahfoud Assem<sup>1,\*</sup>

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U866,\* Institut Federatif de Recherche 100,<sup>†</sup> Faculté de Médecine, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France; Department of Molecular and Cellular Biology,<sup>§</sup> Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030; and Clinical and Administrative Pharmacy,<sup>\*\*</sup> College of Pharmacy, University of Iowa, Iowa City, IA 52242

**Abstract** The nuclear hormone receptor constitutive androstane receptor (CAR, NR1H3) regulates detoxification of xenobiotics and endogenous molecules, and has been shown to be involved in the metabolism of hepatic bile acids and cholesterol. The goal of this study was to address potential effects of CAR on the metabolism of HDL particles, key components in the reverse transport of cholesterol to the liver. Wild-type (WT) mice, transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I (HuAITg), and CAR-deficient (CAR<sup>2/2</sup>) mice were treated with the specific CAR agonist 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP). CAR activation decreased HDL cholesterol and plasma apolipoprotein A-I (apoA-I) levels in both WT and HuAITg mice, but not CAR<sup>2/2</sup> mice. Both mouse apoA-I and human apoA-I were decreased by more than 40% after TCPOBOP treatment, and kinetic studies revealed that the production rate of HDL is reduced in TCPOBOP-treated WT mice. In transient transfections, TCPOBOP-activated CAR decreased the activity of the human apoA-I promoter. Although loss of CAR function did not alter HDL levels in normal chow-fed mice, HDL cholesterol, apoA-I concentration, and apoA-I mRNA levels were increased in CAR<sup>2/2</sup> mice relative to WT mice when both were fed a high-fat diet. **Conclusion** We conclude that CAR activation in mice induces a pronounced decrease in circulating levels of plasma HDL, at least in part through downregulation of apoA-I gene expression.—Masson, D., M. Qatanani, A. L. Sberna, R. Xiao, J. P. Pais de Barros, J. Grober, V. Deckert, A. Athias, P. Gambert, L. Lagrost, D. D. Moore, and M. Assem. Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *J Lipid Res* 2008, 49: 1682–1691.

Supplementary key words: apolipoprotein A-I • bile acids • cholesterol • 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

Constitutive androstane receptor (CAR) belongs to the nuclear receptor family. It was first described as a xenobiotic sensor that responds to a broad range of ligands and regulates the expression of genes involved in both xenobiotic and endobiotic elimination pathways (1–3). Interestingly, several studies have highlighted the role of CAR in cholesterol and bile acid metabolism (4–6) and have suggested complementary roles for CAR, pregnane X receptor (PXR), and farnesoid X receptor (FXR) in preventing bile acid toxicity. CAR may also be able to modulate plasma cholesterol transport and lipoprotein metabolism, although recent studies on the effect of CAR activators on plasma lipoprotein levels in rodents and humans are inconclusive or ambiguous. For example, treatment of epileptic patients or rats with phenobarbital, a dual CAR/PXR activator in humans (7), increases plasma cholesterol and lipoprotein levels (8, 9), and phenytoin, a nonspecific CAR activator (10–12) that activates PXR and other plasma membrane receptors and channels, increases plasma HDL concentration in humans (13, 14). On the other hand, CAR-deficient (CAR<sup>2/2</sup>) mice exhibit higher HDL cholesterol levels than wild-type (WT) mice under cholestatic conditions following bile duct ligation, suggest-

This work was supported by the University of Iowa College of Pharmacy start-up funds, the Conseil Régional de Bourgogne, the Fondation de France, the Université de Bourgogne, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Manuscript received 21 August 2007 and in revised form 11 January 2008 and in revised form 13 February 2008 and in revised form 3 April 2008.

Published: JLR Papers in Press, April 27, 2008.  
DOI: 10.1194/jlr.M700374-JLR200

**Abbreviations** apoA-I, apolipoprotein A-I; CAR, constitutive androstane receptor; CAR<sup>2/2</sup> mice, CAR-deficient mice; CE, cholesteryl ester; FCR, fractional catabolic rate; FPLC, fast-protein liquid chromatography; FXR, farnesoid X receptor; HuAITg mice, transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I; LXR, liver X receptor; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; PXR, pregnane X receptor; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene; WT, wild type.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: mahfoud-assem@uiowa.edu

Copyright © 2008 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>



ing a negative effect of CAR on HDL metabolism, at least in that circumstance (6).

To specifically assess how CAR affects lipoprotein metabolism, we treated WT mice, CAR<sup>2/2</sup> mice (15), and transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I (apoA-I) (HuAITg mice) (16) with the specific CAR agonist 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) (17). Such CAR activation causes a pronounced reduction in HDL cholesterol and apoA-I levels in WT and HuAITg mice, which is absent in CAR<sup>2/2</sup> mice. These results demonstrate that ligand-activated CAR influences HDL metabolism in WT and HuAITg mice.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

C57Bl6 WT mice, C57Bl6 mice, CAR<sup>2/2</sup> mice (15), and C57Bl6 transgenic mice expressing human apoA-I under the control of its natural flanking regions (HuAITg) (16) were used in the present study. TCPOBOP (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) was given at the dose of 3 mg/kg to the mice (8–10 weeks old; five mice per group) by one intraperitoneal injection with 100  $\mu$ l of corn oil as a vehicle. Animals were euthanized 5 days after injection. Mice had free access to water and food, and they were placed on a standard chow diet (Standard AIN-93G rodent diet containing 58.6% carbohydrate, 18.1% protein, 7.2% fat, 5.1% fiber, 3.4% ash, 10% moisture). All protocols and procedures were approved by the National Cancer Institute Division of Basic Sciences Animal Care and Use Committee and are in accordance with the National Institutes of Health guidelines.

For the high-fat diet experiment, the mice were put on a high-fat (Western) diet for 2 weeks. They were injected intraperitoneally with either 100  $\mu$ l of corn oil or TCPOBOP 5 days before the end of the experiment. On the day of sample collection, the mice were fasted for 4 h (7–11 AM). The high-fat Western diet was purchased from Harlan Tekland (Diet 88137; Harlan Tekland, Madison, WI). This diet contains 17% protein, 21% fat, 49% carbohydrate, and 0.15% cholesterol.

No differences in food intake were observed between treated and untreated mice over the 5 day period studied.

### Plasma and liver tissue sampling

Animals were euthanized with isoflurane, and blood samples were collected by intracardiac puncture in heparin-containing tubes that were centrifuged at 5,000 rpm for 10 min. Plasma was harvested and stored at 20°C. Livers were excised, weighed, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at 20°C before mRNA isolation and biochemical analysis.

### Plasma and HDL lipid and protein analysis

All assays were performed on a Victor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Science; Boston, MA). Total cholesterol was measured by the enzymatic method using Cholesterol 100 reagent (ABX Diagnostics; Montpellier, France), and unesterified cholesterol concentration was determined by the cholesterol oxidase para-aminophenazone peroxidase method (Sigma). Esterified cholesterol concentration was calculated as the difference between total and free cholesterol. Triglycerides were determined by enzymatic methods as described previously (18). Protein concentration was measured using bicinchoninic acid reagent (Pierce Biotechnology; Rockford, IL). HDL cholesterol and non-HDL

cholesterol were assayed in d. 1.07 and d. 1.07 g/ml plasma fractions, respectively.

### Fractionation of plasma lipoproteins

Plasma samples (200  $\mu$ l) were injected on a Superose 6 HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Saclay, France) that was connected to a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Amersham Biosciences). Lipoproteins were eluted at a constant 0.3 ml/min flow rate with Tris-buffered saline containing 0.074% EDTA and 0.02% sodium azide. Total cholesterol and triglyceride concentrations were assayed in individual 0.3 ml fractions (18).

### SDS-PAGE of apoB-containing lipoproteins and HDL

ApoB-containing lipoproteins and HDL were isolated by ultracentrifugation as the d. 1.07 g/ml fraction and the 1.07, d. 1.21 g/ml fraction, respectively. Densities were adjusted by the addition of KBr solutions. Samples (5  $\mu$ l) were subjected to electrophoresis on 50–150 g/l polyacrylamide gradient gel (Invitrogen; Carlsbad, CA) as recommended by the manufacturer. Gels were subsequently stained by Coomassie Brilliant Blue, and scanned on a GS-800 densitometer (Bio-Rad; Hercules, CA). Molecular weights were determined by comparison with protein standards that were run in parallel with the samples.

### Native polyacrylamide gradient gel electrophoresis

Total lipoproteins were separated by ultracentrifugation as the d. 1.21 g/ml plasma fraction with one 5.5 h, 100,000 rpm spin in a TLA100 rotor in a TLX ultracentrifuge (Beckman Instruments; Palo Alto, CA). Lipoproteins were then applied to a 15–250 g/l polyacrylamide gradient gel (Spiragel 1.5–25.0; Spiral, Couternon, France), and electrophoresis was conducted as recommended by the manufacturer. Gels were subsequently subjected to Coomassie staining, and the distribution profiles of HDL were obtained by analysis with a Bio-Rad GS-800 Imaging Densitometer. The mean apparent diameters of HDL were determined by comparison with globular protein standards (high-molecular-weight kit; Amersham Biosciences) subjected to electrophoresis together with the samples (18).

### In vivo turnover studies

Mouse HDL was labeled with [<sup>3</sup>H]cholesteryl ether (CE) by the following procedure: Liposomes containing phosphatidylcholine and cholesteryl-1,2-[<sup>3</sup>H]hexadecyl ether were prepared by sonication and were incubated for 18 h at 37°C with WT HDL (1 mg of total protein) plus d. 1.21 infranatant from CE transfer protein-Tg mouse serum. Labeled HDL was subsequently isolated by sequential ultracentrifugation at 1.07 and 1.21 g/ml density in a TLA-100.2 rotor using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman Instruments, Paris, France). Control and TCPOBOP-treated mice were euthanized and injected in the carotid vein with [<sup>3</sup>H]CE-labeled HDL (1.3  $\times 10^5$  cpm). After injection, blood was taken from the tail vein at 0.08, 0.5, 1, 2, 4, 7, and 24 h for determination of radioactivity. The fractional catabolic rates (FCRs) were calculated from the decay curves of [<sup>3</sup>H]CE radioactivity in plasma by fitting the data to a biexponential equation according to the method of Matthews (19). The production rates were calculated by multiplying the FCR by the plasma cholesterol pool and dividing by the body weight.

### Determination of apoA-I concentration

Human apoA-I levels were determined by an immunoturbidimetric assay (Dimension Xpand Dade Behring, Paris, France). Mouse apoA-I concentration was determined by a nonimmuno-



TABLE 1. Plasma lipid parameters in WT or CAR<sup>2/2</sup> mice receiving or not receiving the specific CAR agonist TCPOBOP

	WT (Vehicle) (n 5 5)	WT-TCPOBOP (n 5 5)	CAR <sup>2/2</sup> (Vehicle) (n 5 5)	CAR <sup>2/2</sup> TCPOBOP (n 5 5)
Total cholesterol (mmol/l)	2.01 ± 0.25	0.98 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.13	2.38 ± 0.35 <sup>b</sup>
HDL cholesterol (mmol/l)	1.66 ± 0.16	0.72 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.10	1.84 ± 0.30 <sup>b</sup>
Free cholesterol (mmol/l)	0.66 ± 0.06	0.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.07	0.54 ± 0.09 <sup>b</sup>
Esterified cholesterol (mmol/l)	1.35 ± 0.21	0.73 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.16	1.84 ± 0.28 <sup>b</sup>
Triglycerides (mmol/l)	0.65 ± 0.14	0.61 ± 0.11	0.58 ± 0.09	0.59 ± 0.08

CAR, constitutive androstane receptor; CAR<sup>2/2</sup>, Car-deficient mice; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyl-oxy)] benzene; WT, wild type. Values represent the mean ± SD.

<sup>a</sup>P, 0.05 versus vehicle (Student's t-test).

<sup>b</sup>P, 0.05 versus WT-TCPOBOP (Student's t-test).

logic method. Briefly, plasma samples (0.25 ml) were subjected to electrophoresis on 50–150 g/l polyacrylamide gradient gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) as recommended by the manufacturer. Gels were subsequently stained by Coomassie brilliant blue and scanned on a GS-800 densitometer (Biorad, Hercules, CA). The amount of apoA-I per sample was quantified by comparison with apoA-I standards, which were run in parallel with the samples.

#### RNA isolation and PCR methods

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Specific mRNAs were analyzed by quantitative real time RT-PCR using the ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Briefly, 5 ng of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using MuMLV retrotranscriptase and oligo-dT (Life Technologies). Fifty nanograms of the cDNA mixture was used. Specific cDNAs were amplified using the following primers. Mouse apoA-I: 5'-AAGAGGATGTGGAGCTC-TACC-3' and 5'-TTCTCGCCAAGTGTCTTCAGG-3'; human apoA-I: 5'-GAAGTTGGCAGGAGGAGATGGA-3' and 5'-TCTCG-CTGAGCGTGCTCAGAT-3'; mouse Mrp4: 5'-GGTTGGAATTG-TGGGCAGAA-3' and 5'-TCGTCCGTGTGCTCATTGAA-3'. GAPDH was used as a housekeeping gene because its levels were not altered by TCPOBOP treatment and also because the amplification conditions were very close to those of apoA-I. GAPDH was amplified with primers 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCCTGTTGCTGTTGCTGTA-3'.

Values were normalized to GAPDH levels. Relative mRNA levels were evaluated using the DDCT method.

#### Promoter reporter assay

Promoter regions 2 330/ 1 67, 2 174/ 1 67 and 2 42/ 1 67 of the human APOA-I gene were cloned into pGL3 plasmid. HepG2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. One day before transfection, cells were seeded at a density of 1.3 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>, and transfection was performed 24 h later with TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI). For each well of 24-well plates, 200 ng CAR plasmids and 100 ng pGL3 plasmids were cotransfected. Twenty four hours after transfection, cells were supplied with DMEM with 10% charcoal-stripped serum containing TCPOBOP (1 nM) or androstanol (5 nM). After 24 h incubation, luciferase activities were measured and normalized with β-galactosidase activities.

#### Statistical analysis

Student's t-test was used to determine the significance between the data means. ANOVA with Dunnett's test was used for multiple groups comparison analysis.

## RESULTS

### CAR activation affects HDL and apoA-I levels

Treatment with the specific CAR agonist TCPOBOP induced profound changes in plasma lipid parameters in WT mice (Table 1). After treatment, plasma levels of esterified cholesterol and free cholesterol were significantly decreased (~50% in all cases, P, 0.05), whereas

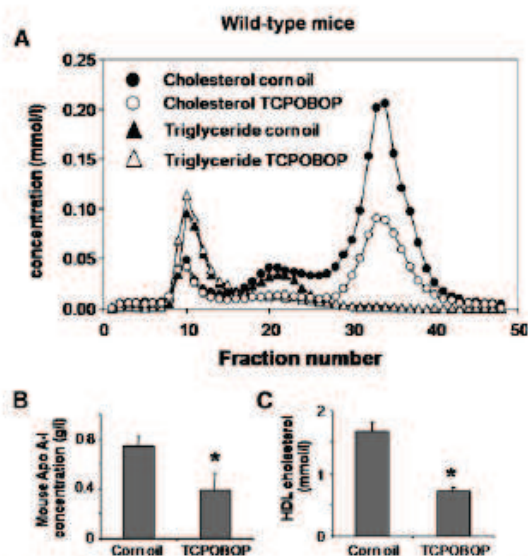


Fig. 1. Fast-protein liquid chromatography (FPLC) analysis of plasma cholesterol, plasma apolipoprotein A-I (apoA-I) concentration, and HDL cholesterol concentration in C57Bl6 wild-type (WT) mice receiving or not receiving the constitutive androstane receptor (CAR) agonist. A: Two-hundred microliters of a pool from five distinct mouse plasma samples was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol and triglyceride contents of individual fractions were determined as described in Materials and Methods. B: Plasma apoA-I concentrations were determined as described in Materials and Methods. C: Plasma HDL cholesterol was determined by an enzymatic method after ultracentrifugation, as described in Materials and Methods. \* Significant difference from mice receiving the control treatment (P, 0.05 in both cases; Student's t-test). Error bars indicate ± SD.





plasma triglyceride levels remained unchanged. HDL cholesterol was mostly affected by the TCPOBOP treatment in WT mice, and gel permeation chromatography analysis as well as native PAGE confirmed that plasma lipid changes were mostly explained by an alteration of the HDL fraction (Figs. 1, 2). A decrease in LDL levels was also observed (Figs. 1, 2), but it did not contribute to a large extent to the decrease in total plasma cholesterol levels.

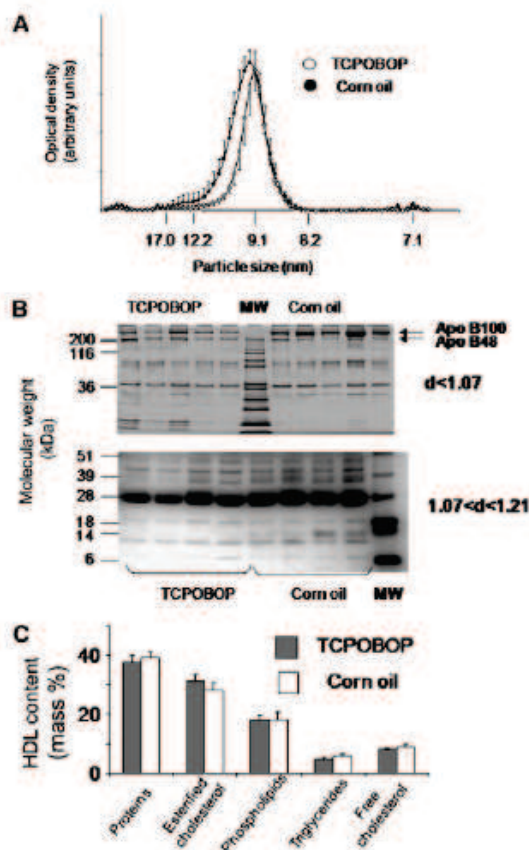


Fig. 2. Characterization of HDL from C57Bl6 WT mice receiving or not receiving the CAR agonist. **A**: HDL size distribution. Total plasma lipoproteins were subjected to electrophoresis on native 15–250 g/l polyacrylamide gradient gels that were stained for proteins as described in Materials and Methods. HDL profiles were obtained by image analysis, and the mean size was calculated, as compared with protein standards. **B**: SDS polyacrylamide gradient gel electrophoresis of apoB-containing lipoprotein and HDL. Lipoproteins were isolated by ultracentrifugation, and apolipoproteins were separated by SDS electrophoresis. Apolipoprotein bands were visualized after Coomassie staining, and molecular mass was calculated by comparison with the protein standards (see Materials and Methods). **C**: Relative composition of HDL fractions. Lipid and protein contents were determined as described in Materials and Methods. Values are expressed as mass percent of total HDL content (phospholipids 1 total cholesterol 1 triglycerides 1 protein).

In addition to plasma lipid changes, plasma apoA-I concentration was significantly reduced in TCPOBOP-treated WT mice (0.56 g/l in WT mice treated with TCPOBOP vs. 0.80 g/l in WT mice receiving the control vehicle,  $P < 0.05$ ) (Fig. 1). In agreement with the tendency toward a reduction in LDL levels, a small decrease in apoB was observed by SDS-PAGE (Fig. 2).

Under basal circumstances, CAR is held in an inactive state in the hepatocyte cytoplasm. As expected, the lipoprotein phenotypes of  $CAR^{2/2}$  and WT mice were similar when animals were given a chow diet, with no significant differences for any of the lipid parameters measured (Table 1), and FPLC distribution profiles of plasma lipoproteins in  $CAR^{2/2}$  mice (Fig. 3) and WT mice (Fig. 1) were identical. The TCPOBOP-mediated changes in plasma lipids and apoA-I observed in WT mice were absent in  $CAR^{2/2}$  mice. In particular, there was no reduction in HDL cholesterol or apoA-I levels after treatment of  $CAR^{2/2}$  mice with TCPOBOP (Table 1, Fig. 3), and FPLC profiles were remarkably similar whether  $CAR^{2/2}$  mice received or did not receive the CAR agonist (Fig. 3).

The human apoA-I transgenic mouse line (HuAITg) has been proven to be a useful model for studying *in vivo* the effect of molecules affecting HDL metabolism (20, 21). As

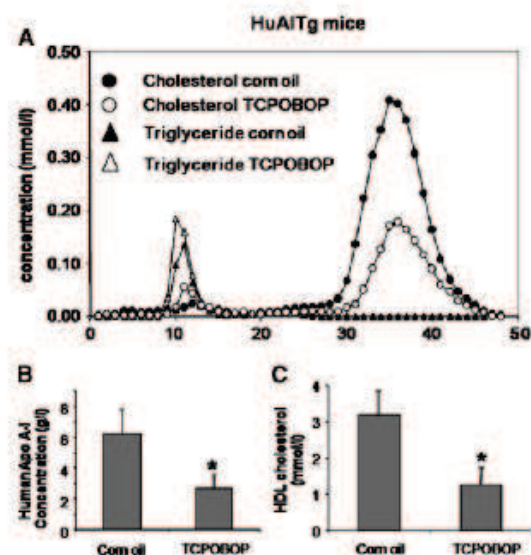


Fig. 3. FPLC analysis of plasma cholesterol, plasma apoA-I concentration, and HDL cholesterol concentration in C57Bl6 HuAITg mice receiving or not receiving the CAR agonist. **A**: Two-hundred microliters of a pool from five distinct mouse plasma samples was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol and triglyceride contents of individual fractions were determined as described in Materials and Methods. **B**: Plasma apoA-I concentrations were determined as described in Material and methods. **C**: Plasma HDL cholesterol was determined by an enzymatic method after ultracentrifugation, as described in Materials and Methods. \* Significant difference from mice receiving the control treatment ( $P < 0.05$  in both cases Student's *t*-test). Error bars indicate 6 SD.

previously reported (16), HuAITg mice showed increased basal apoA-I and total cholesterol levels due to an increase in the HDL fraction (Fig. 4, and Table 1, and Table 2) (16, 21). Again, and as observed above with WT mice, TCPOBOP administration produced profound changes in the plasma lipoprotein profile of HuAITg mice, with ~60% reductions in total cholesterol, esterified cholesterol, HDL cholesterol, and human apoA-I levels ( $P < 0.05$  in all cases) (Fig. 4). As observed in WT mice, the TCPOBOP treatment had no effect on the plasma triglyceride level in HuAITg mice (Table 2).

TCPOBOP treatment reduces the production of HDL

To investigate the effect of CAR activation on HDL kinetics, HDL was labeled with [ $^3\text{H}$ ]CE. This analog of CE behaves in plasma as CE but cannot be hydrolyzed in tissues. The catabolism of CE-labeled HDL tended to be slightly increased in TCPOBOP-treated mice (Fig. 5), but the FCRs were not statistically different between control and TCPOBOP-treated mice ( $3.82 \pm 0.41$  vs.  $4.58 \pm 0.75$  pools/day, respectively; not significant). Conversely, the calculated production rate was significantly reduced in

TABLE 2. Plasma lipid concentration in HuAITg mice receiving or not receiving the specific CAR agonist TCPOBOP

	HuAITg (Vehicle) (n 5)	HuAITg TCPOBOP (n 5)
Total cholesterol (mmol/l)	3.83 $\pm$ 0.56	1.54 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
HDL cholesterol (mmol/l)	3.18 $\pm$ 0.69	1.26 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>
Free cholesterol (mmol/l)	0.79 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Esterified cholesterol (mmol/l)	3.04 $\pm$ 0.50	1.19 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>
Triglycerides (mmol/l)	0.42 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.15

HuAITg mice, transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I.  
<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus vehicle (Student's *t*-test).

the TCPOBOP group as compared with the control group ( $78.9 \pm 15.0$  vs.  $97.2 \pm 5.29$   $\text{mg/day}^{2/3} \text{g}^{-2/3}$ ;  $P < 0.05$ ).

CAR activation is associated with the repression of hepatic apoA-I expression

As expected, the expression of Cyp2b10 (not shown) and MRP4, typical positive CAR target genes (22), was markedly induced by TCPOBOP in the liver of WT and HuAITg mice, whereas no significant changes were observed in  $\text{CAR}^{2/2}$  mice (Fig. 6). In contrast, TCPOBOP treatment of WT mice produced a 30% reduction in the liver mRNA levels of apoA-I ( $P < 0.05$ ; Student's *t*-test). In HuAITg mice, the TCPOBOP treatment produced a 3-fold reduction in the hepatic level of mouse apoA-I mRNA, and a 5-fold reduction in the hepatic level of

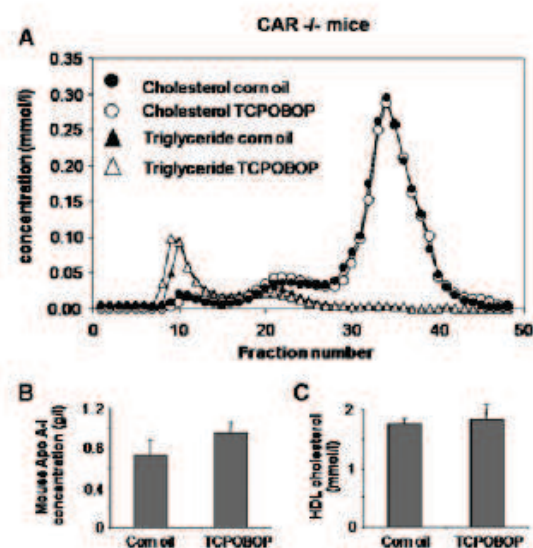
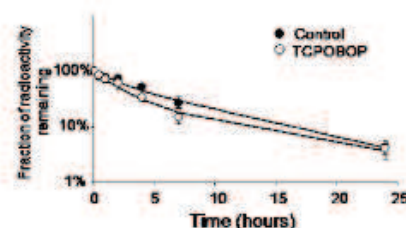


Fig. 4. FPLC analysis of plasma cholesterol, plasma apoA-I concentration, and HDL cholesterol concentration in C57Bl6 CAR-deficient ( $\text{CAR}^{2/2}$ ) mice receiving or not receiving the CAR agonist. A: Two-hundred microliters of a pool from five distinct mouse plasma samples was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol and triglyceride contents of individual fractions were determined as described in Materials and Methods. B: Plasma apoA-I concentrations were determined as described in Materials and Methods. C: Plasma HDL cholesterol was determined by an enzymatic method after ultracentrifugation, as described in Materials and Methods. \* Significant difference from mice receiving the control treatment ( $P < 0.05$  in both cases; Student's *t*-test). Error bars indicate  $\pm$  SD.



**HDL-CE FCR (pools/day)**

Control =  $3.82 \pm 0.41$   
 TCPOBOP =  $4.58 \pm 0.75$

**HDL-CE Production rate ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ )**

Control =  $97.2 \pm 5.29$   
 TCPOBOP =  $78.9 \pm 15.0$

$P < 0.05$  Student *t* test

Fig. 5. Plasma kinetics of HDL labeled with [ $^3\text{H}$ ]cholesteryl hexadecyl ether in control or TCPOBOP-treated WT mice. The tracer was administered by jugular vein injection, and blood samples were taken at the tail vein at the indicated time points and analyzed for radioactivity on a scintillation counter. Values are the fraction of the injected dose remaining at each time point. The curves were fitted using a biexponential equation. Fractional catabolic rate and production rate values were calculated as described in Materials and Methods. Data are given as mean  $\pm$  SD;  $n = 4$  mice/group for each point.

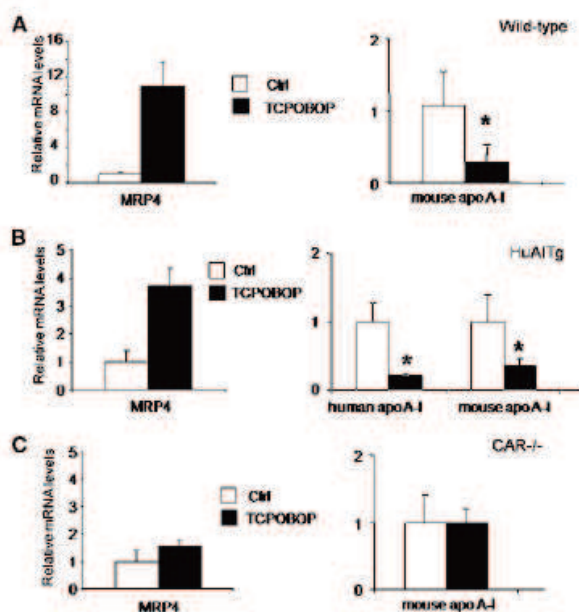


Fig. 6. ApoA-I and MRP4 mRNA levels in the liver of C57Bl6 WT mice (A), HuAITg mice (B), and  $CAR^{2/2}$  mice (C) treated or not treated with the CAR agonist TCPOBOP. Total RNA was extracted from the liver, and apoA-I and MRP4 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. Data were standardized with GAPDH as standard, and mRNA levels in mice treated with corn oil were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD. \* Significantly different from untreated group ( $P < 0.05$ ; Student's *t*-test).

human apoA-I ( $P < 0.05$  in both cases; Student's *t*-test). Again, observed changes were shown to relate specifically to CAR activation, because no significant differences in apoA-I gene expression were observed in  $CAR^{2/2}$  mice treated with TCPOBOP.

CAR represses the activity of the human apoA-I promoter.

To test the hypothesis that CAR downregulates APOA-I at the transcriptional level, three different 5' deletion constructs of the human APOA-I promoter were cotransfected in HepG2 cells, together with an expression vector for CAR, a mutant version of CAR lacking AF-2 function or with the empty vector as control (Fig. 7). Cells were treated with DMSO, TCPOBOP, or the inverse CAR agonist androstanol. CAR markedly repressed the activity of the 2 330 bp apoA-I promoter under basal conditions, and this effect was both enhanced by TCPOBOP and partially reversed by the inverse agonist androstanol. In all cases, the effects were less pronounced with CAR lacking AF-2 function. The repression was still observed with the 2 174 bp apoA-I promoter construct, but was abolished for the 2 41 bp construct. Taken together, these results indicate that the region 2 174/2 43 of the apoA-I promoter contains a disacting element negatively regulated by CAR. Interestingly, this region is highly conserved and is more than 90% homologous to the mouse region (Fig. 7B).

$CAR^{2/2}$  mice display a distinct lipoprotein phenotype when fed a high-fat diet

WT and  $CAR^{2/2}$  mice were fed a high-fat diet for 2 weeks prior to TCPOBOP treatment. As with the chow-fed mice,

CAR activation decreased cholesterol levels in the WT but not the  $CAR^{2/2}$  mice. Under these conditions,  $CAR^{2/2}$  mice display modestly elevated total cholesterol, HDL cholesterol, and apoA-I levels relative to the WT mice (Table 3, Fig. 8). Similar observations were made with apoA-I mRNA levels, with significantly higher levels in  $CAR^{2/2}$  relative to WT mice (Fig. 9).

## DISCUSSION

CAR, a member of the nuclear receptor family was initially described as a xenobiotic sensor (1–3). More recently, its key role in elimination pathways of potentially harmful endogenous molecules has been recognized. In particular, a number of studies have pointed out the relationship between CAR and hepatic cholesterol/ bile acid metabolism (4–6, 23). Specifically, CAR is able to protect the liver against bile acid toxicity by inducing expression of genes encoding proteins involved in 1) the synthesis of hydrophilic 6-OH bile acids at the expense of more hydrophobic and toxic species (24, 25), 2) the sulfonation of bile acids (23, 26), and 3) the excretion of conjugated bile acids (23).

The present study demonstrates that activation of CAR by TCPOBOP decreases plasma HDL levels in WT mice but not in  $CAR^{2/2}$  mice. CAR is inactive under basal conditions and, as expected, CAR deficiency did not result in altered plasma lipoprotein profiles of chow-fed animals. After feeding a high-fat diet for 2 weeks, however,  $CAR^{2/2}$  mice displayed a modest increase in cholesterol



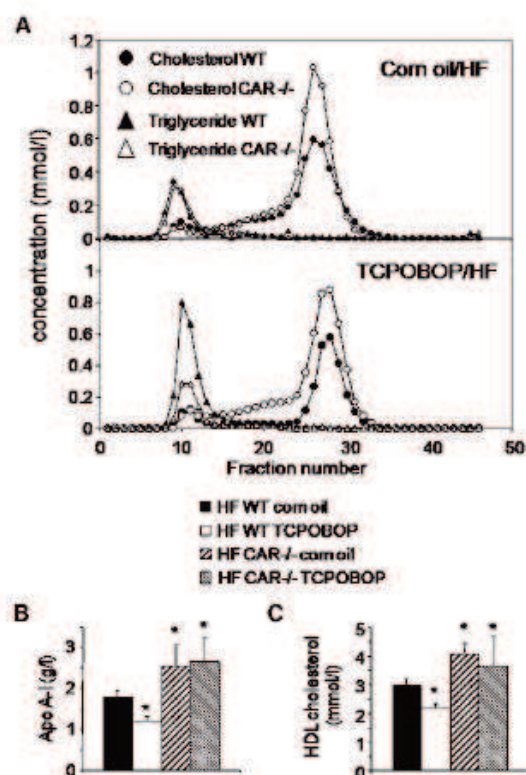


Fig. 8. FPLC analysis of plasma cholesterol, plasma apoA-I concentration, and HDL cholesterol concentration in C57Bl6 WT and CAR<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat diet and receiving or not receiving the CAR agonist. A: Two-hundred microliters of a pool from five distinct mouse plasma samples was passed through a Superose 6 HR column, and total cholesterol and triglyceride contents of individual fractions were determined as described in Materials and Methods. B: Plasma apoA-I concentrations were determined as described in Materials and Methods. C: Plasma HDL cholesterol was determined by an enzymatic method after ultracentrifugation as described in Materials and Methods. \* Significant difference with WT mice receiving the control treatment ( $P < 0.05$  in both cases; ANOVA and Dunnett's test). Error bars indicate 6 SD.

tendencies reported in some earlier studies of the transcriptional regulation of the apoA-I gene. In particular, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) agonists are known to transactivate the human apoA-I gene, whereas they repress mouse apoA-I gene expression (21). The present study indicates that this important limitation of the mouse model does not apply to the regulation of apoA-I expression by CAR agonists that seem to produce similar effects on rodent and human apoA-I. However, observations concerning the effect of CAR on plasma lipoprotein metabolism in humans still remain unclear. Human studies were conducted with either phenobarbital or phenytoin, which, unlike TCPOBOP, are nonspecific CAR agonists inducing only moderate changes in plasma HDL

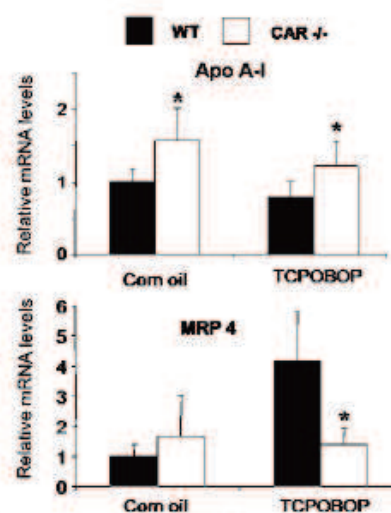


Fig. 9. ApoA-I and MRP4 mRNA levels in the liver of C57Bl6 WT mice and CAR<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat diet and treated or not treated with the CAR agonist TCPOBOP. Total RNAs were extracted from the liver, and apoA-I and MRP4 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described in Materials and Methods. Data were standardized with GAPDH as standard, and mRNA levels in mice treated with corn oil were set at 1.00. Values are means  $\pm$  SD. \* Significant difference with WT mice ( $P < 0.05$ ; Student's *t*-test).

cholesterol and apoA-I levels (8, 10, 11, 13). Furthermore, these drugs are known to also activate PXR and other metabolic pathways as well. This nonspecific action may explain some phenotypic variation. We used only TCPOBOP as CAR activator, because it is the only specific mouse CAR agonist available so far. Phenobarbital is a dual PXR/ CAR agonist; therefore, additional studies are clearly needed to analyze its effects on lipoprotein metabolism in mice lacking the nuclear receptor PXR.

In the present study, we demonstrate that CAR acts at the transcriptional level by inhibiting the activity of the human apoA-I promoter. The detailed mechanism of this repression is uncertain, but several hypotheses are plausible. First, CAR might exert a direct effect on the apoA-I gene promoter. This hypothesis is supported by the fact that CAR behaves as either an activating factor or a repressing factor with several genes, such as carnitine palmitoyl transferase or phosphoenolpyruvate carboxylase, that are negatively regulated by phenobarbital in a CAR-dependent manner (29). Alternatively, CAR might act indirectly, by interfering with other transcriptional regulatory pathways involved in apoA-I gene expression. This might involve a direct competition at the gene promoter level, as reported for LXR (30) or for the recruitment of common coactivators such as PPAR $\gamma$ , proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (Pgc-1 $\alpha$ ), and the glucocorticoid receptor-interacting protein 1 (Grip-1), as reported for FXR and PXR and recently for CAR and HNF-4 (31–33).



Interestingly, the 2174/241 region, which is required for the negative effects of CAR, includes sites B and C of the apoA-I liver-specific enhancer (34). As stated earlier, this region of the apoA-I promoter shows more than 90% homology between humans and mice, suggesting similar mechanisms of regulation in the two species. Although the region contains no evident DR4 elements, which are the preferred binding sites for CAR, it includes a well-characterized DR1 element (2133 to 2120) that is crucial for apoA-I promoter activity (Fig. 7B). This DR1 has been described previously and is able to bind a large variety of homodimers or heterodimers of nuclear receptors (LR-HI, FXR, HNF4, RXR) (35, 36, 37). This further suggests that CAR activation may interfere with other transcriptional pathways (34–36).

In conclusion, the present study demonstrates that CAR activation alters plasma HDL metabolism in WT and HuAITg mice. It is possible that inhibiting the HDL-mediated reverse cholesterol transport pathway contributes to the ability of CAR agonists to preserve normal liver function via downregulation of bile acid synthesis and toxicity.

#### REFERENCES

- Wilson, T. M., and S. A. Kliewer. 2002. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 259–266.
- Xie, W., M. F. Yeuh, A. Rodominska-Pandya, S. P. S. Saini, Y. Negishi, B. S. Bottruff, G. Y. Cabrera, R. H. Tukey, and R. M. Evans. 2003. Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4150–4155.
- Qatanani, M., and D. D. Moore. 2005. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Curr. Drug Metab.* 6: 329–339.
- Guo, G. L., G. Lambert, M. Negishi, J. M. Ward, H. B. Brewer, S. A. Kliewer, F. J. Gonzalez, and C. J. Sinal. 2003. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* 278: 45062–45071.
- Uppal, H., D. Toma, S. P. Saini, S. Ren, T. J. Jones, and W. Xie. 2005. Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. *Hepatology* 41: 165–176.
- Stedman, C. A., C. Liddle, S. A. Coulter, J. Sonoda, J. G. Alvarez, D. D. Moore, R. M. Evans, and M. Downes. 2005. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 2063–2068.
- Lehmann, D. D., M. A. McKee, T. M. Watson, W. J. T. Moore, and S. A. Kliewer. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 102: 1016–1023.
- Aynadi, F. M., F. Orhan, A. Orem, S. Yildirim, and Y. Cedik. 2001. Effect of antiepileptic drugs on plasma lipoprotein (a) and other lipid levels in childhood. *J. Child Neurol.* 16: 367–369.
- Romaschin, A. D., and D. M. Goldberg. 1987. Effect of phenobarbital upon serum cholesterol lipoprotein fractions of three rodent species. *Clin. Physiol. Biochem.* 5: 77–84.
- Jackson, J. P., S. S. Ferguson, R. Moore, M. Negishi, and J. A. Goldstein. 2004. The constitutive active androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2C29. *Mol. Pharmacol.* 65: 1397–1404.
- Wang, H., S. Faucette, R. Moore, T. Sueyoshi, M. Negishi, and E. Le Cluyse. 2004. Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J. Biol. Chem.* 279: 29295–29301.
- Kobayashi, K., S. Yamagami, T. Higuchi, M. Hosokawa, and K. Chiba. 2004. Key structural features of ligands for activation of human pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* 32: 468–472.
- Miller, M., R. G. Burgan, L. Osterlund, J. P. Segrest, and D. W. Garber. 1995. A prospective, randomized trial of phenytoin in nonepileptic subjects with reduced HDL cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 2151–2156.
- Goerd, C., M. Keith, and H. B. Rubins. 1995. Effects of phenytoin on plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *J. Clin. Pharmacol.* 35: 767–775.
- Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang, and D. D. Moore. 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407: 920–923.
- Rubin, E. M., B. Y. Ishida, S. M. Clift, and R. M. Krauss. 1991. Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipoprotein size subclasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 434–438.
- Tzameil, I., P. Pissios, E. G. Schuetz, and D. D. Moore. 2000. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2951–2958.
- Gautier, T., D. Masson, M. C. Jong, L. Duverneuil, N. Le Guern, V. Deckert, J. P. Pais de Barros, L. Dumont, A. Bataille, Z. Zak, et al. 2002. Apolipoprotein C1 deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoC1-knocked out mice. *J. Biol. Chem.* 277: 31354–31363.
- Matthews, C. M. 1957. The theory of tracer experiments with 131I-labelled plasma proteins. *Phys. Med. Biol.* 2: 36–53.
- Srivastava, R. A. K., N. Srivastava, and M. Averna. 2000. Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. *Eur. J. Biochem.* 267: 4272–4280.
- Berthou, L., N. Duverger, F. Emmanuel, S. Langouet, J. Auwerx, A. Guillouzo, J. C. Fruchart, E. Rubin, P. Denefle, B. Staels, et al. 1996. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97: 2408–2416.
- Rubin, E. M., R. M. Krauss, E. A. Spangler, J. G. Verstuyff, and S. M. Clift. 1991. Inhibition of early atherosclerosis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. *Nature* 353: 265–267.
- Assem, M., E. G. Schuetz, M. Leggas, D. Sun, K. Yasuda, G. Reid, N. Zeiger, M. Adachi, S. Strom, R. M. Evans, et al. 2004. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 279: 22250–22257.
- Goodwin, B., E. Hodgson, D. J. D'Costa, G. R. Robertson, and C. Liddle. 2002. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* 62: 359–365.
- Zhang, J., W. Huang, M. Qatanani, R. M. Evans, and D. D. Moore. 2004. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279: 49517–49522.
- Saini, S. P., J. Sonoda, L. Xu, D. Toma, H. Uppal, Y. Mu, S. Ren, D. D. Moore, R. M. Evans, and W. Xie. 2004. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol. Pharmacol.* 65: 292–300.
- Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer, and D. J. Mangelsdorf. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR $\alpha$ . *Cell* 93: 693–704.
- Alberti, S., G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalusy, M. Rudling, B. Angelin, I. Bjorkhem, S. Pettersson, and J. A. Gustafsson. 2001. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR $\beta$ -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107: 565–573.
- Ueda, A., H. Hamadeh, H. K. Webb, Y. Yamamoto, T. Sueyoshi, C. A. Afshari, J. M. Lehmann, and M. Negishi. 2002. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 61: 1–6.
- Handschin, C., M. Podvzinec, R. Amherd, R. Looser, J. C. Ourlin, and U. A. Meyer. 2002. Cholesterol and bile acids regulate xenosensor signaling in drug-mediated induction of cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* 277: 29561–29567.
- Li, T., and J. Y. Chiang. 2004. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 $\alpha$ -



- hydroxylase gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G74–G84.
32. Bhalla, S. C., Ozalp, S., Fang, L., Xiang, and J. K. Kemper. 2004. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 $\alpha$ . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 279: 45139–45147.
  33. Miao, J., F. Sungsoon, Y. Bae, and J. K. Kemper. 2006. Functional inhibitory crosstalk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/ glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 281: 14537–14546.
  34. Delerive, P., C. M. Galardi, J. E. Bisi, E. Nicodeme, and B. Goodwin. 2004. Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein A1 gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 18: 2378–2387.
  35. Harnish, D. C., S. Malik, and S. K. Karathanasis. 1994. Activation of apolipoprotein A1 gene transcription by the liver-enriched factor HNF-3. *J. Biol. Chem.* 269: 28220–28226.
  36. Claudel, T., E. Sturm, H. Duez, I. P. Torra, A. Srvent, V. Kosyk, J. C. Fruchart, J. Dallongeville, D. W. Hum, F. Kuipers, et al. 2002. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A1 transcription via a negative FXR response element. *J. Clin. Invest.* 109: 961–971.
  37. Tzameli, I., and V. I. Zannis. 1996. Binding specificity and modulation of the apoA1 promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 8402–8415.

*Imprim' Service*



**IMPRIM' SERVICE**  
90, rue de Mirande  
21000 DIJON  
Tél & Fax: 03 80 65 30 74